

Univerzita Karlova  
Pedagogická fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Klaudia Baloghová

Univerzita Karlova

Pedagogická fakulta

Katedra biologie a environmentálních studií

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Fenylketonurie

Phenylketonuria

Klaudia Baloghová

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D.

Studijní program: Specializace v pedagogice

Studijní obor: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na vzdělání –  
Chemie se zaměřením na vzdělání

2018

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Fenylketonurie potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze dne 12.07.2018

.....

podpis

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Lenka Pavlasová, Ph.D. za její čas věnovaný mé práci, její cenné rady, připomínky a vždy vstřícný přístup.

## **ANOTACE**

Fenylketonurie je dědičně podmíněna metabolická choroba, která způsobuje neschopnost organismu zpracovat aminokyselinu fenylalanin. Tak vznikají organismu patologické procesy, které při nedodržení léčby vedou k nevratnému poškození mozku a mentální retardaci. Práce se zabývá vznikem nemoci, její diagnostikou, léčbou a četností výskytu v České republice a v zemích Evropské unie.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

fenylketonurie, fenylalanin, fenylalaninhydroxyláza

## **ANNOTATION**

Phenylketonuria is inherited metabolic disease, which causes failure of amino acid phenylalanine metabolism. In this way is formed pathological process that leads to irreversible damage of brain and mental retardation if therapy fails. This thesis deals with formation, diagnosis, treatment and occurrence of this disease in Czech Republic and countries of the Europe Union.

## **KEYWORDS**

phenylketonuria, phenylalanine, phenylalaninehydroxylasa

## OBSAH

1 Úvod	8
2. Cytogenetika	9
2.1 Buňka	9
2.2 Dělení buňky	10
2.3 Dělení jádra	10
2.4 Chromosomy	14
2.4.1 Interfázní chromosom	14
2.4.2 Mitotický chromosom	15
2.5 Gametogeneze	17
2.5.1 Spermatogeneze	17
2.5.2 Oogeneze	18
2.6 Karyotyp	18
2.6.1 Metody zpracování a barvení chromosomů	19
2.6.2 Cytogenetické barvicí techniky	20
2.6.3 Jak genetici označují umístění genu?	21
3. Mendelovská dědičnost	22
3.1 Monohybridismus	22
3.2 Dihybridismus	23
3.3 Využití Mendelových zákonů v medicíně	24
4. Genetické mutace	26
4.1 Vznik genetických mutací	26
4.2 Druhy genetických mutací	26
4.3 Genetická mutace u fenylketonurie	28
5. Dědičné poruchy metabolismu (DPM)	28
5.1 Dědičnost DPM	29
5.2 Patogeneze DPM	29
5.3 Klinické projevy	29
5.4 Fenylalanin a jeho metabolismus	30
5.5 Poruchy metabolismu fenylalaninu	30
5.5.1 Nedostatek fenylalaninhydroxylázy	31
5.5.2 Poruchy metabolismu biopterinu	31

6. Fenylketonurie (PKU)	31
6.1 Charakteristika	31
6.2 Genealogie PKU	32
6.3 Zdravotní důsledky	32
6.4 Maternální PKU	33
6.5 Psychologické dopady	33
7. Diagnostika PKU	34
7.1 DNA diagnostika	34
7.2 Historie novorozeneckého screeningu PKU	36
7.2.1 Plošný screening	37
7.3 Biochemické vyšetření fenylketonurie	38
7.4 BH <sub>4</sub> senzitiva	38
7.5 Prevence	39
8. Léčba	39
8.1 Dietologie	39
8.1.1 Potraviny a výživa	39
8.1.2 Defekt PAH s BH <sub>4</sub> senzitivitou	40
8.2 Enzymová substituční terapie	41
8.3 Genová terapie	41
9. Statistika PKU v ČR a Evropských zemích	42
10. Závěr	44
11. Seznam informačních zdrojů	46

## 1. Úvod

Bakalářská práce se zabývá jednou z dědičných metabolických poruch (DMP) – fenylketonurií. Fenylketonurie (PKU) je vrozená porucha metabolismu. Znamená to, že dítě se s touto nemocí přímo narodí. Příčinou vzniku je porucha metabolických drah, které zajišťují důležité životní funkce lidského organismu. Jde zejména o správný vývoj centrální nervové soustavy, která ovlivňuje psychomotorický vývoj dítěte.

Vzhledem ke klinické rozmanitosti, velké četnosti nemoci a poměrně nízkému výskytu každé jednotlivé vzácné nemoci v populaci, nemívali praktičtí lékaři a často ani odborníci různých specializací znalosti o příslušné chorobě. Pak pacient musel absolvovat různé vyšetření, putoval zdravotnickým systémem od odborníka k odborníkovi a diagnóza vzácné choroby se typicky stanovila až s několikaletým odstupem od začátku klinických problémů. Proto se v České republice od roku 1975 začal provádět novorozenecký screening.

Předložená práce vznikla především na základě studia odborné literatury, ale také na základě poznatků, které jsem načerpala na týdenní odborné stáži v Diagnostických laboratořích Ústavu dědičných metabolických poruch VFN a 1.LF UK. Stáž proběhla na zdravotnickém pracovišti, které se zabývá laboratorní diagnostikou a léčbou dědičných metabolických poruch (DMP), monitorováním kompenzace pacientů s DMP a prenatální diagnostikou u rodin pacientů s DMP. Pracoviště také provádí celonárodní novorozenecký screening. Pracovala jsem pod vedením primářky laboratorní části paní Ing. Karolíny Peškové.

Seznámila jsem se s problematikou diagnostiky dědičných metabolických poruch, a to na úrovni metabolitů, enzymů a genů, přístrojovou laboratorní technikou, laboratorním informačním systémem a principy profilových vyšetření. Dalším pracovištěm, které jsem navštívila, byla Cytogenetická laboratoř v Ústavu biologie a lékařské genetiky VFN a 1. LF UK.

Cílem mé bakalářské práce je poskytnout přehled dostupných informací o PKU z oblasti genetiky, biochemie a medicíny.



## 2. CYTOGENETIKA

Cytogenetika je jedním z podoborů genetiky, která sleduje počty a strukturu chromosomů v dělících se buňkách organismů (Otová a Mihalová, 2012).

### 2.1 Buňka

Buňka je základní stavební a funkční jednotka živých organismů. Je to nejmenší živý útvar schopný samostatní existence a rozmnožování. Každá buňka má svůj vlastní genetický a proteosyntetický aparát a metabolický systém, který umožňuje buňce samostatně přeměňovat a využívat energii. Vždy je ohraničena membránou, která reguluje průnik látek dovnitř buňky a ven z buňky. Existují dva typy buněk. Prokaryotní, která je typická pro prokaryotní organismy jako jsou bakterie, sinice a prochlorofyty. Druhým typem je eukaryotní buňka. Eukaryotní buňka je typická pro eukaryotní organismy jako jsou rostliny, houby a živočichové (Sládek, 2007).



Obrázek 1. Stavba eukaryotní buňky člověka<sup>1</sup>

### 2.2 Dělení buňky

Dělení buňky nazýváme cytokineze. Po dělení jádra následuje dělení cytoplasmy. Každá z dceřiných buněk získá přibližně polovinu všech organel. Sled procesů, které probíhají v buňce od jejího rozdělení nazýváme jako buněčný cyklus.

---

<sup>1</sup> Dostupné online : <http://www.studiumbiochemie.cz/bunka3.html>

Zahrnuje růst buňky a její složek a vlastní dělení buňky. Buněčný cyklus má několik fází. Jako první je předsyntetická (postmitotická) fáze, kterou nazýváme jako G1 fáze. Dochází zde ke syntéze RNA a proteinů a dotváří se buněčné organely. Během G1 fáze (vzácněji v G2 fázi) mohou buňky reverzibilně přecházet do klidové G0 fáze. Příkladem jsou lymfocyty, které v tomto klidovém stádiu přetrvávají dny až roky a teprve po aktivaci opět pokračují v buněčném cyklu. Plně diferencované buňky jako jsou neurony setrvávají trvale v G0 fázi a dále se nedělí. Jako syntetickou fázi nazýváme S fázi buněčného cyklu, kdy buňka syntetizuje (replikuje) DNA. Po S fázi následuje postsyntetická (předmitotická) G2 fáze, při které se buňka připravuje na mitózu. Pak následuje mitóza jako M fáze buněčného cyklu. Období mezi dvěma mitózami nazýváme jako interfáze (Otová a Mihalová, 2012).

## 2.3 Dělení jádra

Všechny buňky se rozmnožují dělením, při kterém nové dceřiné buňky vznikají z již existujících buněk mateřských. Dělení buňky předchází dělení, které nazýváme jako karyokineze. Dělení předchází replikace DNA v chromosomech během syntetické fáze dělení buňky. Vznikají dvě dceřiné chromatidy, které jsou spojené pomocí centromery. V tělních (somatických) buňkách jsou chromosomy v párech, tedy je jich diploidní počet ( $2n$ ). Pohlavní buňky obsahují jen poloviční počet chromosomů ( $n$ ). Jádra tělních buněk člověka obsahují 46 chromosomů a jádra pohlavních buněk 23 chromosomů.

Rozlišujeme nepřímé dělení jádra mitózu a redukční dělení jádra meiózu. Mitóza probíhá u většiny buněk a zaručuje přesné rozdělení genetického materiálu mezi dceřiné buňky. Je rozdělena na několik fází. První je profáze, která následuje po G2 fázi interfáze. Začíná mírným zvětšením jádra, které způsobuje příjem vody z okolní cytoplazmy. Spiralizaci chromatinu se chromosomy postupně zkracují a sílí, což má důležitý funkční význam. Chromosomy se zviditelňují a mají tvar tenkého vlákna. Od začátku profáze se hmota chromosomů formuje do dvou vláken-chromatid, které jsou vlastně samostatné funkční jednotky spojené centromerou. Dvojice chromosomů putují k opačným pólům. Na konci profáze se rozpadá jaderný obal, mizí jadérko a chromosomy jsou ve vysokém stupni spiralizace. Vzniká mitotický aparát, formují se astrální a kinetochorová vlákna dělicího vřeténka. Celá profáze trvá 30-60 minut. Druhou fází je metafáze, kterou lze členit na metakinezi (prometafáze) a vlastní metafázi. Při metakinezi začíná shromáždění a uspořádání chromosomů do ekvatoriální roviny buňky. Dochází

k autoorientaci chromosomů svými kinetickými místy na centromere směrem k pólům buňky a k distribuci chromosomů. V metafázi jsou chromosomy specificky uspořádány v ekvatoriální rovině. Dochází k největší spiralizaci a zkrácení chromosomů, a proto se v tomto stádiu provádí cytogenetické studie založené na morfologii chromosomů. Na centromeru chromosomů se připojuje dělicí vřeténko. Po metafázi následuje anafáze. Na počátku nastane simultánní rozdělení centromer a oddělení sesterských v centromerách. Na centromery připojené dělicí vřeténko svojí kontraktivní činností přesouvá chromosomy z ekvatoriální roviny k pólům buňky. Při podélném rozdělení centromery jsou k opačným pólům přesouvány kopie chromosomů vytvořených při replikaci DNA. Rozdělení chromosomů je poměrně rychlé, proto anafáze trvá jen několik minut. Zároveň postupně dochází k prodlužování buňky a začíná cytokineze. Telofáze je charakteristická seskupením chromosomů u pólů buňky. Chromosomy se postupně despiralizují a rozplétají do funkční, aktivní formy. Jaderná membrána se opět obnovuje a spojuje a v obou nových jádrech se objevují jádérka. Dělicí vřeténka zanikají a buňka se fyzicky rozdělí cytokinezí.

Meióza je proces, při kterém vznikají pohlavní buňky, které prošly dvojím dělením jádra a mají haploidní počet chromosomů. Jejich splynutím vzniká zygota, která obsahuje diploidní počet chromosomů (Otová a Mihalová, 2012).

Primordiální zárodečné buňky (embryonální buňky, které jsou předchůdci gamet) se začínají diferencovat ve stěně žloutkového vaku. Z něho v šestém týdnu embryonálního vývoje migrují do urogenitálních lišt. Podílí se spolu se somatickými buňkami na vzniku primitivní gonády. Primitivní gonády se diferencují v testes nebo ovaria v souhlasu s chromosomální výbavou (XX, XY). Primordiální zárodečné buňky dospějí po řadě mitotických dělení do stádia primárních spermatocytů a, nebo oocytů. Z nich meiotickým dělením vznikají gamety. Vznik samičích gamet se liší zejména v časovém průběhu (Otová a Mihalová, 2012).

Meióza je dělení, při kterém je redukován počet chromosomů z diploidního ( $2n$ ) na haploidní ( $n$ ). Gamety vznikají po dvou následných děleních, a to meióze I a meióze II, mezi kterými je krátká interfáze (interkineze), ale nedochází k replikaci DNA. Pro meiózu I je charakteristické párování homologních chromosomů v profázi I a jejich rozchod v anafázi I. Meióza I je tedy vlastní redukční dělení. Meióza II se podobá mitotickému dělení. V anafázi II dochází k rozchodu sesterských chromatid k pólům buňky.

První meiotické dělení (meióza I) má několik fází. Prvním je profáze I, která se liší od profáze mitózy a můžeme ji rozdělit na leptotén, zygotén, pachytén, diplotén a diakinezi.

V leptoténu se chromosomy stávají viditelnými, ale není ještě možné rozlišit jejich sesterské chromatidy. V zygoténu se párují homologní chromosomy a podélně k sobě přiléhají. Jsou spojeny trojvrstevným proteinovým synaptonemálním (synaptickým) komplexem. Synaptonemální komplex je specializovaná struktura patrná v elektronovém mikroskopu, která leží mezi vlákny chromatinu. Pachytén je fáze, ve které každý chromosomový pár tvoří bivalent se čtyřmi chromatidami (tetráda). Vznikají rekombinační uzlíky (noduly). Mezi chromatidami může docházet k překřížením (crossing-overu) a výměnám úseků homologních chromosomů. Výměna homologních úseků mezi nesesterskými chromatidami vede k rekombinacím. To znamená, že může u potomků dojít ke změně v postavení alel na homologních chromosomech, než jaké bylo na chromosomech rodiče. Výměna homologních úseků mezi sesterskými chromatidami uspořádání alel neovlivňuje. U člověka dochází v průměru ke 2-3 překřížením na každém páru homologních chromosomů. K tomu, aby se chromosomy při meióze správně rozešly do gamet je nezbytné, aby došlo k alespoň jednomu crossing-overu v každém homologním páru. U mužů se párují gonosomy X a Y v krátkých pseudoautosomálních oblastech umístěných v blízkosti telomer. Diplotén je fáze, kdy se uvolňují homologní chromosomy z bivalentu a jsou spojeny chiasmaty (rekombinační uzlíky). Dochází k postupné terminalizaci chiasmat. Chiasmata přidržují homologní chromosomy pohromadě až do anafáze I. Sesterské chromatidy stále drží spolu centromera. Během diakineze se chromosomy maximálně spiralizují a zkracují (Otová a Mihalová, 2012).

Metafáze I je fáze, kdy na její počátku mizí jaderný obal. Tvoří se dělicí vřeténko. Párové chromosomy jsou přiřazené k sobě a leží v ekvatoriální rovině. Centromerami (svými kinetochory) směřují k pólům buňky. V anafázi I se dvouchromatidové chromosomy pohybují pomocí mikrotubulů dělicího vřeténka k protilehlým pólům buňky. Počet chromosomů je tak redukován na polovinu. Rozchod párových chromosomů je náhodný. Dochází k nezávislé segregaci a kombinaci chromosomů v gametách. Z toho vyplývá, že původně paternální a maternální chromosomy se dostávají do náhodných kombinací. Možný počet kombinací chromosomů v gametách člověka (23 párů) je  $2^{23}$ . Genetická variabilita je navíc zvyšována rekombinacemi mezi nesesterskými chromatidami.

V anafázi I i II může dojít k chybám při rozchodu chromosomů k pólům buňky. Během anafáze může též dojít ke ztrátě chromosomu. Porucha rozchodu (nondisjunkce) homologních chromosomů v anafázi I nebo chromatid v anafázi II, nebo jeho ztáta je příčinou numerických

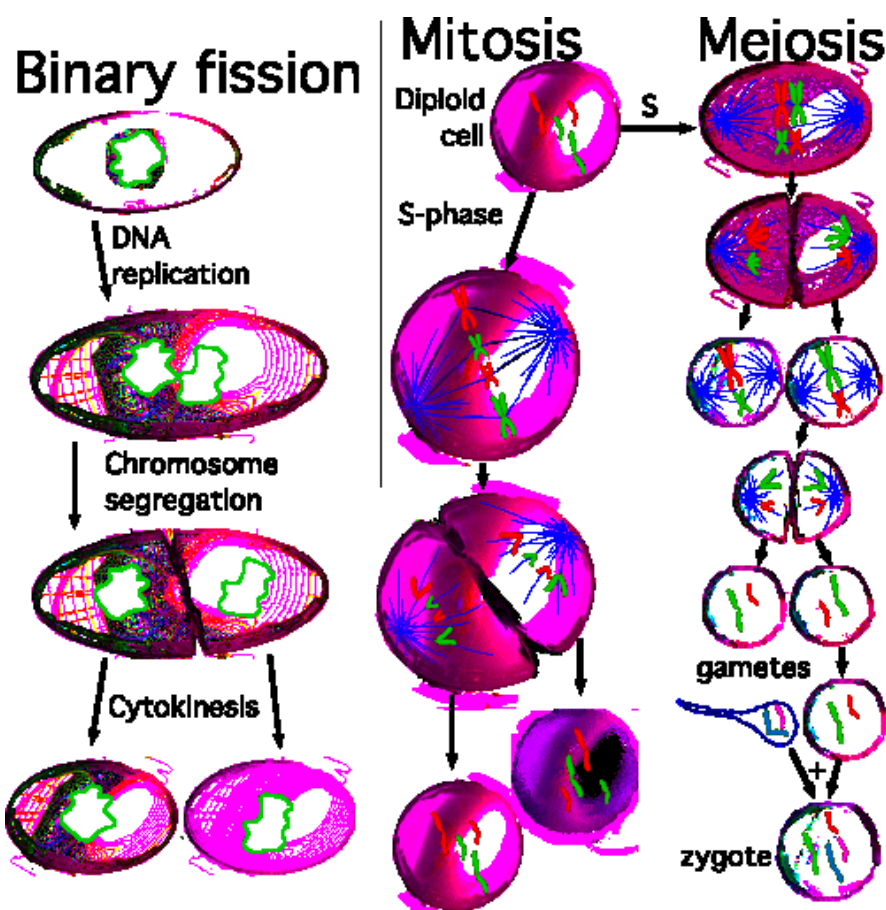
odchylek (numerických aberací). Gamety s aberovaným počtem chromosomů mohou být příčinou zamezení vývoje zygoty (potraty) nebo vzniku syndromů.

V telofázi I dochází k charakteristickému seskupení haploidní sady chromosomů v protilehlých pólech buňky.

Po telofázi následuje cytokineze, kdy se buňka dělí na dvě haploidní buňky a vstupuje do interfáze. Při spermatogenezi je cytoplazma rozdělena mezi dceřiné buňky rovnomerně. Při oogenezi je rozdělení cytoplazmy nepravidelné. Jeden produkt dělení-sekundární oocyt, získá téměř všechnu cytoplazmu a druhá buňka se stane prvním polárním tělískem.

V interfázi chromosomy jen částečně dekondezují.

Druhé meiotickém období je obdobné jako u mitózy. Vznikají čtyři haploidní buňky (Otová a Mihalová, 2012).



Obrázek 2. Schéma mitózy a meiózy<sup>2</sup>

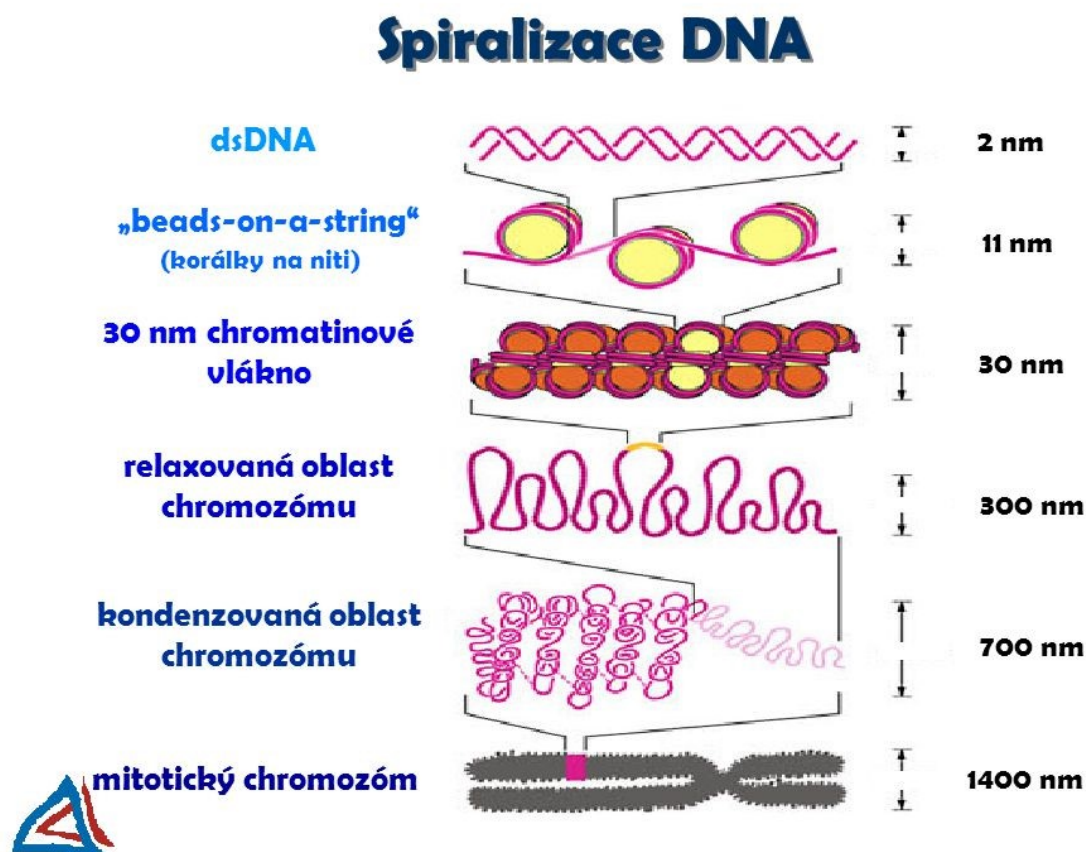
<sup>2</sup> Dostupné online: <http://lisabon.blog.cz/1108/rozmnozovanie-buniek>

## 2.4 Chromosomy

Když se buňka začíná dělit, materiál jejího jádra-chromatin ztrácí svůj relativně homogenní vzhled, který je typický pro nedělící se buňky. Chromatin se kondenzuje a vytváří chromosomy. Genetická informace se skládá z jednotek, které nazýváme jako geny. Jsou zabudované v deoxyribonukleové kyselině chromosomů. Chromosom tvoří dvě ramena, která jsou spojena centromerou (SLÁDEK, 2007).

### 2.4.1 Interfázní chromosom (chromatin)

Interfáze je období mezi dvěma mitózami. Nukleus je ohraničen jaderným obalem a vnitřní strukturu tvoří dekondezované interfázní chromosomy.



Obrázek 3. Schéma spiralizace chromosomu<sup>3</sup>

<sup>3</sup> Dostupné na: <https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-image-chromosom-image11898256>

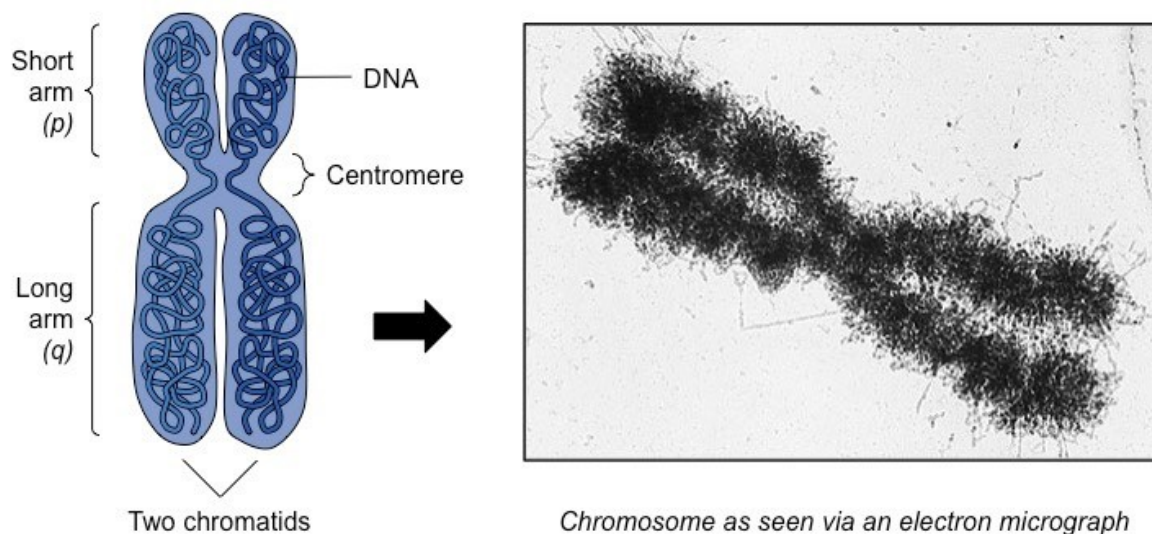
Histony jsou specifické bazické proteiny. Na struktuře DNA se podílí celkem pět typů histonů. Rozeznáváme histony-H1, H2A, H2B, H3, H4 a H5. Čtyři z nich se spolu s DNA podílí na struktuře základní jednotky chromatinu-nukleosomu.

Každý nukleosom se skládá z osmi histonů: 2x (H2A, H2B, H3, H4). Tyhle histony tvoří tzv. proteinový střed, kolem kterého se vyskytuje přibližně 146 párů bází. Nukleosomy jsou opakující se jednotky, které jsou spojené vláknem DNA a pátým histonem H1. Histon H1 se také účastní vzniku vyšších struktur při závitnicovém stáčení vlákna DNA. Vyšší strukturou je solenoid-spiralizované uspořádání nukleosomů (1 závit tvoří asi 6 nukleosomů a nese 1200 bazových párů) (Otova a Mihalová, 2012).

#### **2.4.2 Mitotický chromosom**

Mitóza je vlastní dělení buňky. Při cytokineze dochází k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromatinu a vznikají kompaktní útvary-mitotické chromosomy. Mitóza se dělí na několik fází: profáze, prometafáze, metafáze, anafáze, telofáze a cytokineze. Struktura mitotických chromosomů je nejlépe pozorovatelná v metafázi a to díky své charakteristické struktuře. Jsou tvořeny dvěma identickými sesterskými chromatidami, které k sobě přiléhají v profázi a v metafázi se naopak oddalují. Jsou spojeny v oblasti centromery. Rozděluje chromosom na dlouhé a krátké p raménko.

Podle polohy centromery rozlišujeme chromosomy na metacentrické-centromera je přibližně stejné vzdálenosti od p a q raménka, submetacentrické-centromera rozděluje chromosomální raménka na delší a kratší část, akrocentrické-centromera dělí chromosom na dlouhé raménko q a na velmi malé raménko p, na kterém se nacházejí repetitivní sekvence tvořící cytogenetické útvary NORy (nukleolární organizátor), který nese tandemově multiplikované geny pro ribosomální RNA, telocentrické-lokalizace centromery je na konci chromosomu (karyotyp člověka telocentrické chromosomy neobsahuje) (Sládek, Zbyšek, 2007).

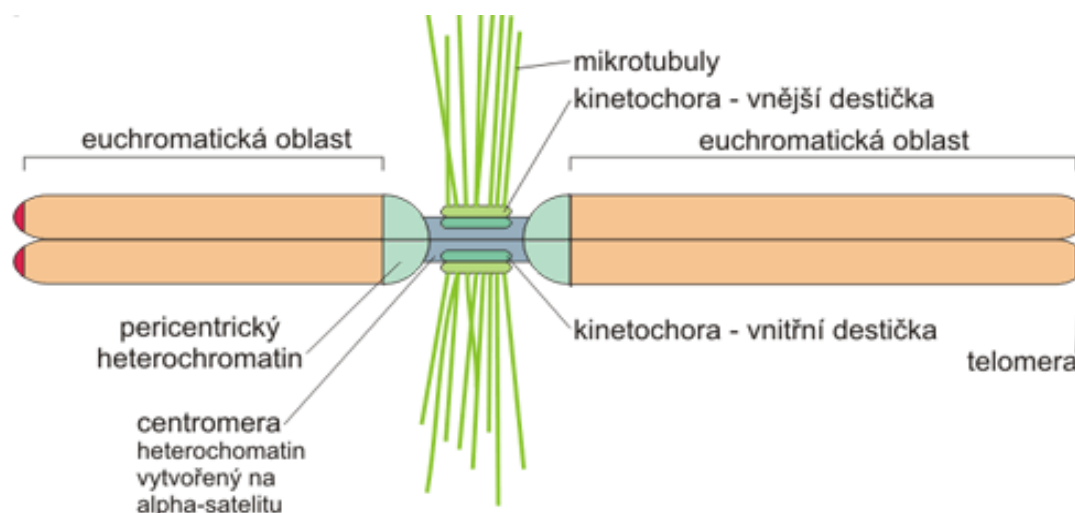


Obrázek 4. Mitotický chromosom <sup>4</sup>

Centromera je ztenčená oblast chromosomů, která obsahuje repetitivní sekvence-satelitní DNA. Alfa-satelit tvoří heterochromatin centrální části centromery. Mimo proteiny asociované s heterochromatinem se na centromeru váží "proteiny vážící se na alfa satelit", které vytvářejí "vnitřní kinetochorovou destičku". Některé z těchto proteinů jsou vázané s centromerou v průběhu celého buněčného cyklu. Na "vnitřní kinetochorové destičce" se sestavuje "vnější kinetochorová destička" která interaguje s mikrotubuly dělicího vřeténka. Centromera je často obklopena pericentromerickým heterochromatinem, který je tvořen jinými typy satelitních sekvencí. Konce chromozomu (telomery) jsou tvořeny telomerickou repeticí TTAGGG, navazující úseky subtelomerických oblastí jsou také vysoce repetitivně (Otova a Mihalová, 2012).

<sup>4</sup> Dostupné na :<https://www.dreamstime.com/royalty-free-stock-image-chromosome-image11898256>





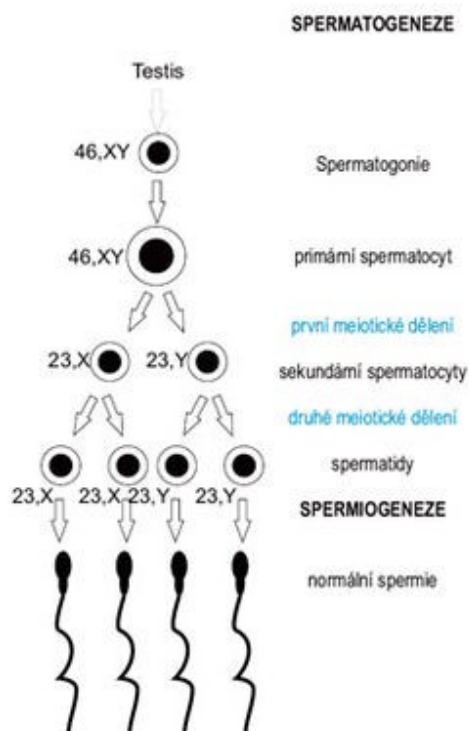
Obrázek 5. Struktura lidského mitotického chromosomu<sup>5</sup>

## 2.5 Gametogeneze

### 2.5.1 Spermatogeneze

Spermie vznikají v semenných kanálcích testes od počátků pohlavní dospělosti. Kanálky jsou vyplněny spermatogoniemi, které jsou v různých stádiích vývoje. Tyto buňky se vyvinuly po sérii mitóz z primordiálních zárodečných buněk. Poslední typ vývojové řady je primární spermatocyt. Primární spermatocyt prodělává první meiotické dělení. Vznikají dva haploidní sekundární spermatocyty. Sekundární spermatocyty přecházejí do druhého meiotického dělení. Z každého vznikají spermatidy, které se diferencují do spermií. Tvorba spermií u člověka trvá přibližně 64 až 72 dní (Otová a Mihalová, 2012).

<sup>5</sup> Dostupné na: <http://www.biomach.cz/genetika/-chromosomy>

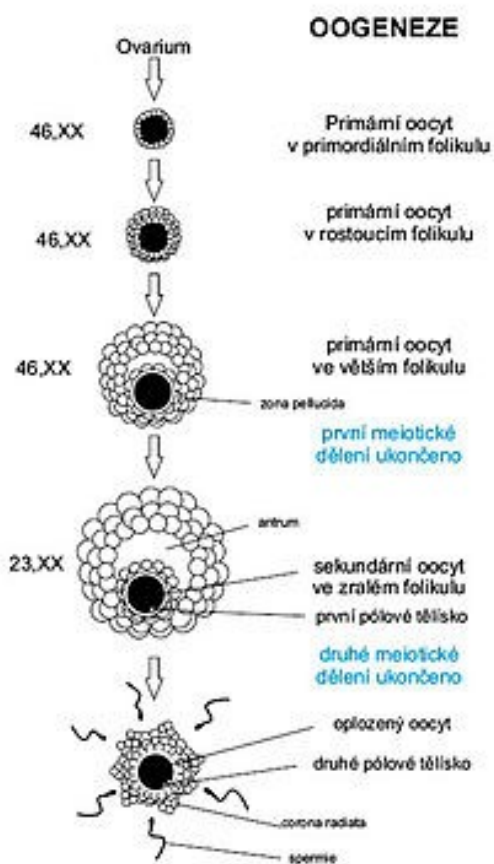


Obrázek 6. Spermatogeneze<sup>6</sup>

### 2.5.2 Oogeneze

Oogeneze je na rozdíl od spermatogeneze zahájena před narozením. Vaječníky se vyvíjí v oogoniích (buněk kortexu ovaria), které vznikly z primordiálních zárodečných buněk serií přibližně 30 mitóz. Každé oogonium je obaleno vrstvou folikulárních buněk. Do třetího měsíce prenatalního vývoje se oogonia postupně diferencují na primární oocyty. Nesynchronně vstupují do profáze meiózy I. V době narození jsou všechny v profázi I. V profázi I je meiotické dělení přerušeno (stadium zvané dictyotén) a v stádiu dictyotén oocyty setrvávají do sexuální dospělosti. Jakmile žena dosáhne sexuální dospělosti, jednotlivé folikuly dozrávají, nastává ovulace. Oocyt pokračuje v meióze I, rozdělí se na sekundární oocyt s většinou cytoplasmy a organelami a na polární tělísko. Ihned začíná meióza II a během ovulace meióza II dospěje do metafáze. Meióza II je dokončena pouze po oplodnění (fertilizaci). Po fertilizaci je ukončeno druhé meiotické dělení, vznikne vajíčko a druhé polární tělísko. Chromosomy vajíčka a spermie vytvoří prvojádra, každé má jadernou membránu. Prvojádra fúzí, vzniká diploidní zygota. Chromosomy zygoty se replikují a zygota se následně mitoticky rozdělí na dvě dceřiné buňky. Tím je embryonální vývoj zahájen (Otová a Mihalová, 2012).

<sup>6</sup> Dostupné na: <https://myloview.cz/obraz-spermatogeneze-a-oogeneze-c-2EF934F>



Obrázek 7. Oogeneze <sup>7</sup>

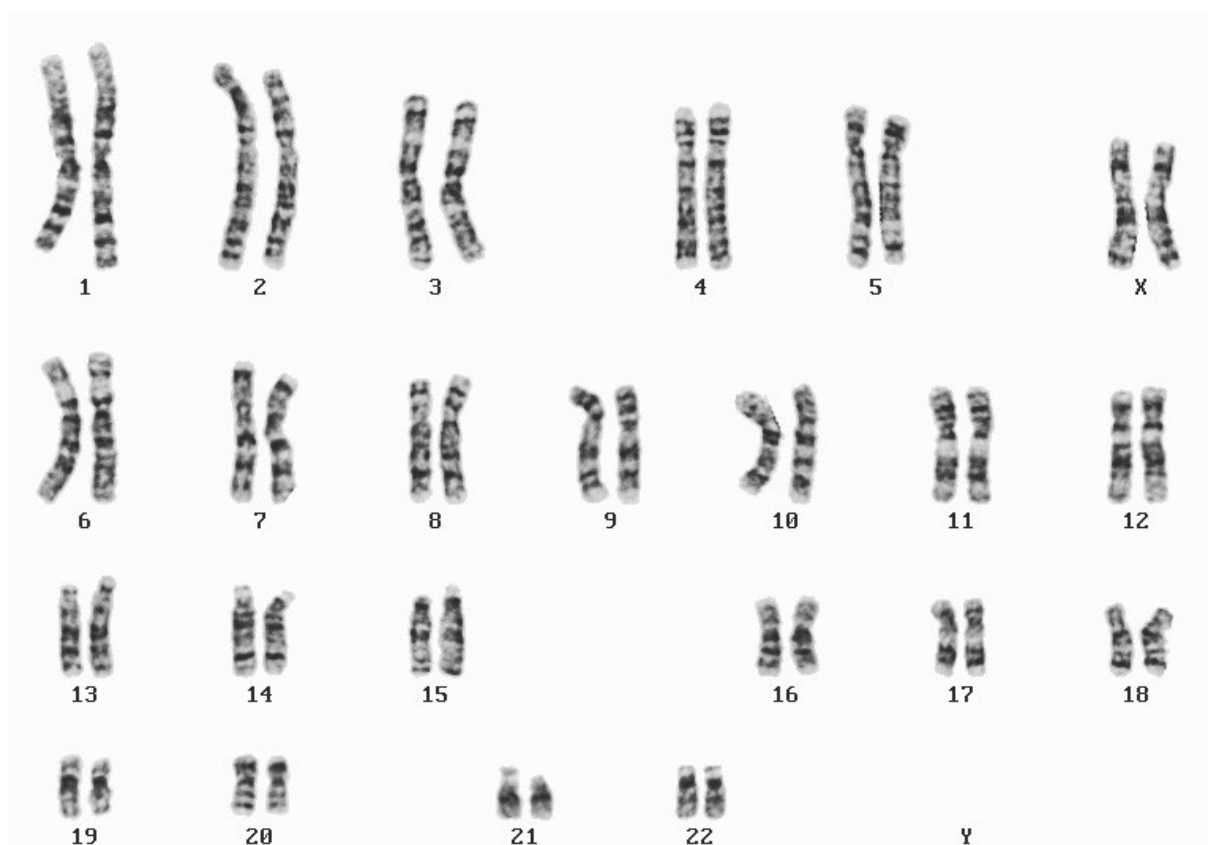
## 2.6 Karyotyp

Lidská somatická buňka obsahuje 23 homologních párů chromosomů. U obou pohlaví je stejných 22 párů nazývaných jako autozomy. Jeden pár chromosomů je tvořen pohlavními chromosomy, které nazýváme jako gonozomy.

Za normálních okolností jsou páry chromosomů mikroskopicky neodlišitelné. Platí to i pro ženské pohlavní chromosomy, které značíme XX. U mužů se pohlavní chromosomy navzájem liší. Jeden z nich je stejný jako u žen, získávají ho od matky a předávají svým dcerám. Druhý chromosom Y muži dědí od otce a předávají ho svým synům. Karyotyp je schéma zobrazující všechny sady chromosomů buňky daného jedince. Každý organismus má vlastní pro něj typický karyotyp. Při popisu chromosomů se používá mezinárodní cytogenetická nomenklatura ISCN (An International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009).

<sup>7</sup> Dostupné na: <https://mylovview.cz/obraz-spermatogeneze-a-oogeneze-c-2EF934F>

Ženský karyotyp je zapisován jako 46, XX a mužský jako 46, XY. Autosomy jsou na základě barvicích technik seřazeny do idiogramu podle velikosti, který tvoří schéma pro identifikaci jednotlivých chromosomů. Gonosomy se řadí jako poslední. Základní identifikace chromosomu je založena na jejich velikosti a tvaru (Otova a Mihalová, 2012).



Obrázek 8. Karyotyp ženy <sup>8</sup>

### 2.6.1 Metody zpracování a barvení chromosomů

Pro cytogenetické vyšetření je nutno získat dělicí se buňky. Nejčastějšími buňkami jsou lymfocyty (bílé krvinky) periferní krve, a to díky přítomnosti jádra, které například v buňkách erytrocytů (červené krvinky) nenacházíme. Potřebná je krátkodobě kultivována a heparinizována (zabrání srážení) krev o objemu 2ml. Kultivace probíhá při teplotě 37 °C. V průběhu dělení buňky se mitotická aktivita stimuluje mitogenem fytohemaglutininem. Po třech dnech je kultivace ukončena a je přidán mitotický jed kolchicin, který naruší funkci dělicího vřeténka. Tím se buněčné dělení zastaví v metafázi, ve které jsou chromosomy nejlépe pozorovatelné.

<sup>8</sup> Dostupné na: <https://myloview.cz/obraz-spermatogeneze-a-oogeneze-c-2EF934F>

Další zpracování vyžaduje přidání hypotonického roztoku k sedimentu buněk a fixaci směsí methanolu a kyseliny octové. Upravený sediment je zároveň materiálem pro barvení a následné hodnocení mitóz (Otová a Mihalová, 2012).

### 2.6.2 Cytogenetické barvicí techniky

Existuje mnoho metod pro barvení chromosomů, ale mezi nejčastěji používané patří pruhování. Jedná se o konvenční barvení, které představuje barvení Giemsovým barvivem, díky kterému získáme homogenně zbarvené chromosomy, které dnes používáme pro hodnocení získaných aberací (zlomů).

Pruhování je typem barvení, kterým dosáhneme střídání světlých a tmavých pruhů po celé délce chromosomů. G-pruhování je založeno na barvení Giemsovým barvivem po natrávení trypsinem. Pruhování vzniká jako výsledek heterogenity chromatinu, který se vyskytuje ve dvou formách-heterochromatin a euchromatin.

Heterochromatin je část chromosomu, která obsahuje jen málo anebo žádné aktivní geny. Patří tam oblast centromery nebo značná část Y chromosomu. Naopak část chromosomu, která obsahuje aktivní geny nazýváme jako euchromatin. Tvoří smyčky DNA, ve kterých se nacházejí geny, které kódují proteiny. G-pruhováním se heterochromatin zbarvuje tmavě a euchromatin světle.

R-pruhování (reverzní pruhování) je dalším typem pruhování, které je opakem G-pruhování.

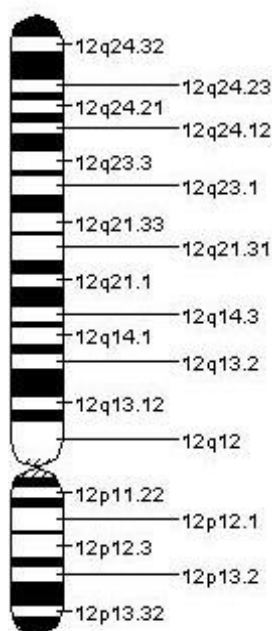
C-pruhování je barvení typické pro specifické oblasti chromosomu. Mezi specifickou oblast můžeme zařadit například centromery nebo specifické heterochromatinové úseky chromosomů. Akrocentrické chromosomy, které obsahují satelity jsou barveny tzv. Ag-NOR barvicí technikou.

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) spojuje postupy klasické cytologie a technologie molekulární genetiky. Je založena na schopnosti jednovláknové (dentaurované) DNA sondy vázat se k cílové sekvenci nukleotidů, jejichž uspořádání je dáno komplementaritou bází. DNA sonda je předem označena fluorescenčním barvivem a výsledný signál je analyzován pomocí fluorescenčního mikroskopu. Tato metoda se využívá jak pro pozorování chromosomů v interfázi, tak pro pozorování mitotických chromosomů (KOČÁREK, Eduard, 2008).

### 2.6.3 Jak genetici označují umístnění genu?

Pro popis umístnění určitého genu na daném chromosomu používáme tzv. genetické mapy. Genetické mapy popisují relativní pozici genového lokusu podle frekvence rekombinací. Umístnění genu naznačujeme na obarveném chromosomu anebo je pro přesný popis genu využita jeho molekulární poloha, která je založena na přesné sekvenci DNA bloků.

V případě fenylketonurie jde o chromosomální zápis: 12q22-q24. Gen, který nese informaci o enzymu fenylalaninhydroxyláze (PAH), je umístěn na q-raménku 12. chromosomu (12q22-q24). Chromosom obsahuje 13 exonů, je kolem 90 kb (kilobáze) dlouhý a kóduje cca 2400 bází. Kombinace čísel a písmen poskytuje “adresu“ genu na chromosomu, která se skládá z několika částí. Číslo 12 naznačuje, že jde o mutaci na 12. chromosomu (autosomu), takže se nejedná o pohlavně vázanou nemoc. Písmeno q značí, že lokalizace mutace je na dlouhém q raménku 12. chromosomu. Rozmezí čísel od 22-24 reprezentuje region a pásmo výskytu mutace na q raménku 12. chromosomu. Číslo zvyšující polohu genu se zvyšuje s odstupem od centromery (Pritchard D.J., 2007).



Obrázek 9. Chromosom č.12<sup>9</sup>

<sup>9</sup> Dostupné na : [http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas\\_cyto1.html](http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_cyto1.html)

### 3. Mendelovská dědičnost

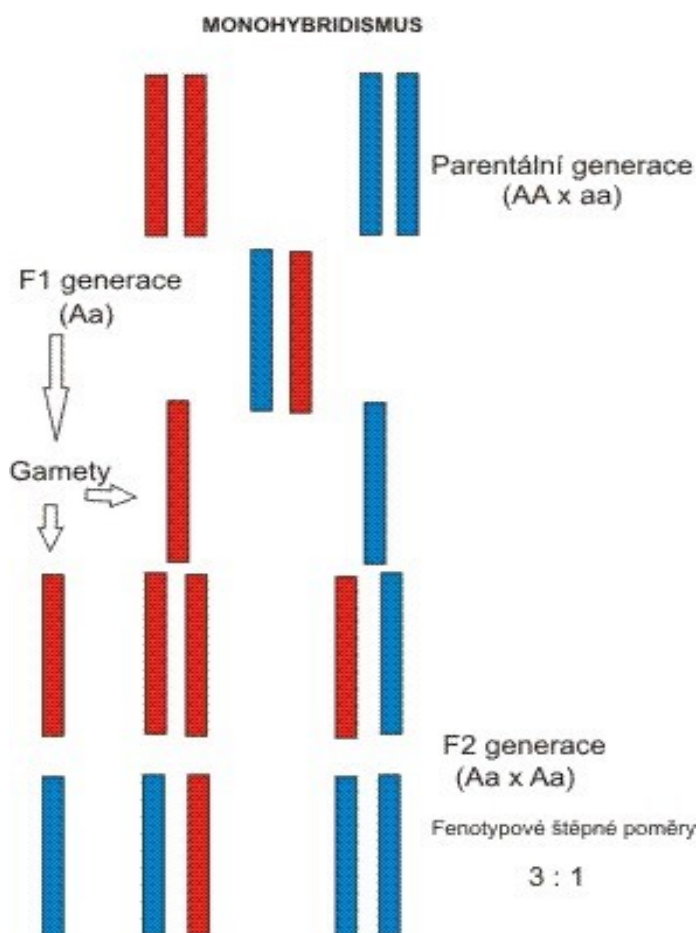
Genetika se jako vědní obor začala systematicky rozvíjet ve dvacátém století. Zakladatelem genetiky je brněnský opat Johan Gregor Mendel. Bez znalosti podstaty přenosu genetické informace matematickou analýzou hybridizačních pokusů vyvodil, že rodič má dva párové faktory, které podmiňují znak. Na potomka se přenáší od každého rodiče pouze jeden z nich.

Klasické Mendelovy pokusy se zahradním hrachem daly základ poznatkům o přenosu genů z jedné generace do generace další. Při hybridizačních pokusech s hrachem si Mendel vybral sedm párů odlišných znaků, například kulatá nebo svraštělá zrna, vysoké rostliny a zakrslé, červené a bílé květy, zelená a žlutá semena a další (Otová a Mihalová, 2012).

#### 3.1 Monohybridismus

V hybridizačním pokusu Mendel sledoval jeden pár vybraných znaků, například zabarvení semen. Při hybridizačních pokusech vždy začínal křížení rostlin od tzv. „čistých linií“ pro sledovaný znak. Parentální linie (rodičovské) byli tedy homozygotní pro zvolenou variantu znaku. Křížením jedinců parentální generace získal hybridy první filiální generace (F1) a jejich samosprášením potomstvo druhé filiální generace (F2). Ve všech pokusech se všechny rostliny v F1 generaci vždy podobaly pouze jednomu z rodičů. F1 generace byla vždy uniformní. Proto uniformitu F1 generace nazýváme 1. zákonem dědičnosti Mendelova typu. Ty znaky, které se u F1 hybridů manifestovaly ve fenotypu, nazval Mendel dominantní a ty, které se v F1 generaci nemanifestovaly, recesivní. Po samosprášení rostlin F1 generace se v F2 generaci vyskytly jak rostliny s dominantním fenotypem, tak s recesivním. Dominantní a recesivní znaky byly vždy v poměru 3:1. Přechodné formy mezi znaky nebyly pozorovány. Samosprášením jednotlivých rostlin F2 generace vznikla F3 generace. Rostliny s recesivním fenotypem v F2 generaci měly v F3 generaci pouze potomstvo s tímto fenotypem. Potomstvo rostlin s dominantním fenotypem, mělo v F3 generaci převážně dominantní, ale i recesivní fenotyp. Mendel z těchto pokusů odvodil, že fenotypový štěpný poměr 3:1 v F2 generaci je podmíněn genotypovým štěpným poměrem 1:2:1. Z těchto párových „faktorů“ pouze jeden je předáván potomkovi. Který z nich je náhodný jev. Tento závěr je označován jako 2. Mendelův zákon, zákon o náhodné segregaci genů do gamet.

Když Mendel provedl zpětné křížení hybridních rostlin F1 generace s recesivními homozygoty parentální generace, vyskytly se u nich oba znaky v následující generaci v poměru 1:1. Tento typ štěpení je nazýván 3. Mendelův zákon (Otová a Mihalová, 2012; KOČÁREK, 2008).



Obrázek 10. Monohybridismus <sup>10</sup>

### 3.2 Dihybridismus

V další sérii pokusů Mendel zkoumal u hrachu dva znaky současně. Například rostliny s kulatými a žlutými semeny a se semeny svařetými a zelenými.

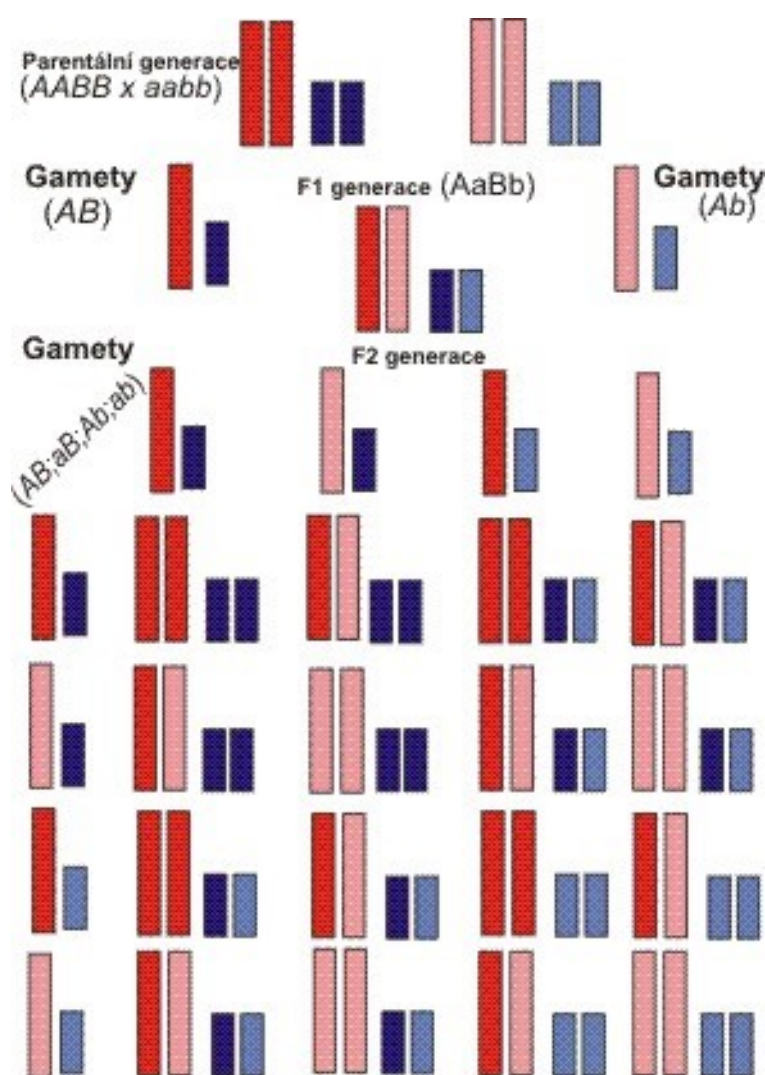
F1 generace byla uniformní. V tomto případě byla semena kulatá a žlutá. V F2 generaci vznikly čtyři fenotypové kombinace v poměru 9:3:3:1. Pomocí zpětného křížení jedinců F1 generace s dvojnásobnými recesivními homozygoty parentální generace tvoří čtyři fenotypové třídy v poměru 1:1:1:1. Fenotypy s oběma dominantními znaky, s jedním znakem dominantním a druhým recesivním, reciproce, a s oběma znaky recesivními.

<sup>10</sup> Dostupné na : <https://slideplayer.cz/slide/1977210/>

Sledování dvou znaků současně ukázalo, že odlišné genové páry segregují do gamet na sobě nezávisle. Tento fakt je nazýván 4: Mendelovým zákonem. Zákonitost volné kombinovatelnosti genů v gametách platí v případě, že sledované geny jsou lokalizovány na různých párech



chromosomů. Volná kombinovatelnost genů nastává i v případě jejich lokalizace na stejném chromosomu při mapové vzdálenosti 50 cM. Štěpné poměry vyplývající z Mendelových zákonů jsou odrazem pravděpodobnosti, s jakou jednotlivé typy potomků mohou vznikat. V reálných hybridizačních experimentech mohou být empiricky získané štěpné poměry ovlivněny náhodnými statistickými odchylkami. Proto je vždy nezbytné shodu empirických štěpných poměrů s určitým předpokladem způsobu dědičnosti ověřovat pomocí statistických pravděpodobnostních testů (Otová a Mihalová, 2012; KOČÁREK, 2008).



Obrázek 11. Dihybridismus <sup>11</sup>

<sup>11</sup> Dostupné na : <https://slideplayer.cz/slide/1977210/>

### 3.3 Využití Mendelových zákonů v medicíně

Experimentální výsledky Mendelových pokusů jsou využívány i v oblasti medicíny. Dědičnými chorobami se zabývá síť pracovišť lékařské genetiky. Genetické poradenství poskytuje informaci o onemocnění vyskytujícím se v rodině, hodnotí, zda je nebo není dědičně podmíněné a jaká je pravděpodobnost jeho výskytu u dalších členů rodiny. Poskytuje rodině informaci, jak genetickým rizikům čelit. Podmínkou pro posouzení situace je znalost diagnózy a sestavení co nejobsáhlejšího rodokmenu. V současné době je u většiny monogenně děděných chorob možné navázat na pravidla Mendelovské dědičnosti a metodami molekulární genetiky určit jedince s mutovanou alelou.

Autosomálně recesivní onemocnění se manifestuje jen u recesivních homozygotů. Pro choroby podmíněné autosomálně recesivně platí, že zdravým rodičům se může narodit postižené dítě. Pak to znamená, že oba rodiče jsou heterozygoti pro daný gen. Zdravý sourozenec postiženého dítěte může být pro sledovaný gen heterozygotem s pravděpodobností  $2/3$  nebo dominantním homozygotem s pravděpodobností  $1/3$ . Obě pohlaví jsou postižena se stejnou pravděpodobností.

Dvěma zdravým heterozygotům se narodí postižené dítě s 25 % pravděpodobností, což vyplývá z Mendelova pravidla o segregaci genů do gamet a náhodné kombinaci gamet při oplození u monohybridismu. Příbuzenské sňatky výskyt autosomálně recesivního onemocnění zvyšují.

Mezi nejčastější příklady autosomálně recesivních onemocnění můžeme zařadit cystickou fibrózu, galaktosemii nebo srpkovitou anémii.

Dalším typem je autosomálně dominantní onemocnění. Pro tento typ dědičnosti je charakteristické, že se onemocnění většinou vyskytuje v každé generaci rodokmenu u jedinců obou pohlaví. Zdravý jedinec jsou recesivní homozygoti. Příkladem je polycystická choroba ledvin, hypercholesterolémie, huntingtonova chorea nebo neurofibromatóza.

Autosomálně dominantně jsou podmíněné i některé vývojové vady. Jsou to například vady vývoje prstů. Syndaktylie představuje srostlé prsty a příčinou je porucha průběhu apoptózy. Brachydaktylie jsou zkrácené články prstů a polydaktylie více prstů.

Gonosomální recesivně dědičná onemocnění se vyskytují u genů lokalizovaných na pohlavních chromosomech. Otec předává X chromosom všem svým dcerám, Y chromosom synům. Matka předává X chromosom jak synům, tak dcerám s 50 % pravděpodobností pro každý z jejích dvou X chromosomů. Chromosomy X a Y si nejsou rovnocenné. Na X chromosomu, na rozdíl od Y chromosomu, je lokalizována široká škála genů. Gonosomální onemocnění jsou ty, které jsou podmíněné mutacemi v genech lokalizovaných na chromosomu X. Gonosomálně recesivní

choroby postihují převážně muže. U mužů se projevuje pseudodominantní efekt, což znamená, že k fenotypovému projevu vede přítomnost jedné recesivní alely na chromosomu X. Ženy bývají přenašečky X-vázaných onemocnění, postiženy jsou jen velmi zřídka. Příkladem gonosomálně recesivních chorob je hemofilie typu A, hemofilie typu B, daltonismus, nebo Duchennova muskulární dystrofie.

Gonosomálně lokalizovaná dominantně dědičná onemocnění mají dominantní alelu lokalizovanou na chromosomu X. Manifestují se nejen u mužů, ale i u heterozygotních žen. Heterozygotní žena má postižené děti s 50 % pravděpodobností pro obě pohlaví. Pokud je postižen muž, jsou postiženy všechny jeho dcery, všichni synové jsou zdraví. Mezi nejznámější patří D-vitamin resistantní rachitis (křivice) (Pritchard, 2007; Kočárek, 2007).

## 4. Genetické mutace

### 4.1 Vznik genetických mutací

Mutací se označují veškeré náhodné změny v DNA. Hlavní důvodem mutací v DNA může být náhodná „spontánní“ mutace, nebo může být způsobena působením mutagenu, tzv. „indukovaná“ mutace. Spontánní mutace nejsou ovlivněny vnějšími vlivy a bývají způsobeny chybným zařazením nukleotidů při replikaci DNA, například při meióze. Indukované mutace jsou vyvolány vnějším působením mutagenu, přímým či nepřímým. Přímé působení mutagenu vyvolá poškození DNA a nepřímé působení zvýší pravděpodobnost vzniku mutace. Charakter mutagenů lze roztrždit do tří skupin: fyzikálních, chemických a biologických. Fyzikální mutageny jako UV záření, způsobují rozrušení vazeb DNA nebo chemickou přeměnu nukleotidů. Chemické mutageny mohou svou virovou DNA zařadit do DNA hostitele a mohou tak přerušit některý z genů. Mutace mohou poškodit genetickou výbavu v různém rozsahu. Může jít o tzv. genové mutace ovlivňující jeden gen, bodové mutace, které změní jeden nukleotidový pár, ale může jít i o mutace, které mohou způsobit změnu struktury nebo změnu počtu chromosomu, což označujeme jako mutaci chromosomovou (Kočárek E., 2007).

### 4.2 Druhy genetických mutací

Mutace na chromosomální úrovni rozdělujeme na chromosomové aberace, numerické odchylky a strukturní odchylky. Numerické odchylky lze rozlišit na polyploidie a aneuploidie. Polyploidie můžeme charakterizovat jaké znásobení haploidního počtu více jak dvakrát, takže místo vzniku diploidní sady chromosomů vzniká triploidní i tetraploidní sada. Polyploidie chromosomů embrya není slučitelná se životem a zpravidla dochází k samovolným potratům. Aneuploidie je zmnožení nebo chybění jednoho chromosomu. Nejčastější aneuploidii je trisomie, tj. přítomnost nadbytečného chromosomu v páru. Trisomie vznikají na mnoha různých genech, například trisomie 21. Chromosomu je známa jako Downův syndrom, trisomie 18 chromosomu jako Edwardsův syndrom a trisomie 13. chromosomu jako Patauův syndrom. Méně častou aneuploidii je monosomie, kdy v chromosomovém páru jeden chromosom chybí. Známým příkladem monosomie je Turnerův syndrom, kdy dívkám chybí jeden chromosom X. Strukturní odchylky vznikají záměnou sekvencí mezi stejnými nebo různými chromosomy, případně chybou při reparaci chromosomálních zlomů. Strukturní aberace zahrnují translokace, delece, kruhové chromosomy, duplikace, inverze, izochromozomy a centrické fragmenty.

Translokací chápeme výměny chromosomového obsahu mezi chromosomy, které podle příčiny rozlišujeme na centrické fúze, reciproké translokace a inzerční translokace. Centrická translokace vzniká fúzí dvou chromosomů, které obsahují v okolí centromer zlomy. Centrická translokace se vyskytuje u akrocentrických chromosomů 13, 14, 15, 21 a 22 obsahujících informace pro syntézu rRNA (ribosomální RNA), které jsou obsaženy v mnoha kopiích na ostatních chromosomech. Reciproká translokace na rozdíl od centrické probíhá jen v rámci jednoho chromosomu a také se označují jako tzv. interchromosomové. Inzerční translokace je nejvzácnější a dochází při ní k přesunutí intersticiálního segmentu na jiné místo bez jeho náhrady na jiný segment. Translokace nemá důsledky pro jedince, u kterého vzniknou, mohou však ohrozit potomstvo vytvořením nestálé chromosomální vrstvy.

Deleci rozumíme úplnou ztrátu části chromosomu s geny. Proces delece vzniká chybnou reparací dvou zlomů, nerovnoměrným crossing-overem (kombinací částí chromosomů např. při vzniku gamet) při předešlé meióze nebo jako následek translokace u rodiče. I zde se může jednat o terminální (okrajovou) nebo intersticiální (vmezeřnou) sekvenci. Kruhovité chromosomy označované také jako „ring“ – prstencové, vznikají při deleci dvou míst na stejném chromosomu s následným propojením. Pokud kruh obsahuje centromeru, může být zachován do dalších buněčných dělení. Duplikace v chromosomu vytváří dvě kopie určitého segmentu chromosomu, které na sebe navazují. K inverzi (převrácení), dochází v případě, že se na chromosomu objeví dva zlomy a vzniklý segment se zpět připojí obráceně. Podle přítomnosti centromery v inverzním segmentu rozlišujeme pericentrickou (obsahuje centromeru) a paracentrickou (bez centromery) inverzi. Stejně jako u translokací může inverze způsobit vznik nebalancovaných gamet. Poslední z výčtu strukturních odchylek je izochromozom. U chromosomů s touto vadou chybí jedno raménko, a zároveň druhé raménko je duplikované. Izochromosomy embryí jsou častou příčinou spontánních potratů. Při výskytu izochromosomu na chromosomu X vyniká stejně jako při monosomii Turnerův syndrom (Thomson, 2004; Kočárek, 2007).

#### **4.3 Genetická mutace u fenylketonurie**

Vláknem DNA obsahuje velké množství genů a každý gen lze přiřadit ke konkrétnímu úseku DNA. Tento úsek se označuje jako lokus. Chromosom 12 je velmi bohatý na lokusy spojené s různými onemocněními, kde se vyskytuje ze 487 lokusů 5,2 % známých genů nemocí. Gen,

který nese informaci o enzymu fenylalaninhydroxyláze (PAH), je umístěn na q-raménku 12. chromosomu (12q22-q24). Chromosom obsahuje 13 exonů, je kolem 90 kb (kilobáze) dlouhý a kóduje cca 2400 bází. Mutace může být lokalizována na všech 13 exonech, ale i v sousedných sekvencích. Exony PAH genu zahrnují 2,88 % genomové sekvence. Nejkratším exonem je exon 9, který obsahuje 57 bazických párů (dále jen bp). Nejdelší je exon 13 s obsahem 892 bp. Nejkratším intronem je intron 10 s 556 bp a nejdelší je intron 2 s 17874 bp.

Osoby s deficitem PAH jsou většinou heterozygoty a mají dvě různé mutace. Forma hyperfenylalanémie (HPA), kterou lze zmapovat na lokusu PAH, je klasická PKU a mírná PKU. Rozdíl mezi klasickou a mírnou PKU souvisí s různými alelami PAH. Další forma HPA, kterou na PAH lokusu zmapovat nelze, zahrnuje mutaci v genech kódujících enzymy na syntézu a recyklaci tetrahydrobiopterinu (BH<sub>4</sub>). Mutace v genech kódujících syntézu BH<sub>4</sub> tvoří zhruba 2 % pacientů s HPA (rozdíl klasické, mírné a PKU s deficitem BH<sub>4</sub>) (Thomson, 2004; Kočárek, 2007).

## 5. Dědičné poruchy metabolismu

Jako první termín dědičné poruchy metabolismu (DPM; původní název *inborn errors of metabolism*) použil anglický lékař sir Archibald Garrod (1875-1936) v roce 1908 pro pojmenování čtyř metabolických onemocnění: alkaptonurie, pentosurie, cystinurie a albinismu. Garrod si všiml, že ze čtyř rodin, kde měli zdraví rodiče nemocné děti, se ve třech rodinách vyskytoval příbuzenský sňatek. V tu chvíli popřel dosavadní domněnku o infekčním původu alkaptonurie a ukázal, že nemoc se dědí na základě mendelovských zákonů. Prohlásil ji za nemoc poruchy metabolismu s dědičnou konstitucí.

U člověka bylo v roce 2013 popsáno 1540 enzymů a mezinárodní společnost SSIEM bylo klasifikováno 700 různých DMP. Počet dosud popsaných genů, jejichž mutace vedou k DPM, se odhaduje na více než 1 000 a DPM tak představují cca 15 % všech onemocnění ze skupiny vzácných nemocí.

Fenylketonurie (PKU) je klasickým příkladem DPM aminokyselin a zároveň první nemoci, u které byl proveden celoplošný novorozenecký screening. Neléčenou PKU, která se vyznačovala těžkou mentální retardací, křečemi a specifickým zápachem moči a potu pacienta po myšíně, popsal v roce 1934 norský lékař a chemik Asbjørn Følling.

Název fenylketonurie jako první zavedl Lionel Penrose, který přišel na to, že snížený příjem bílkovin u dětí s PKU vede k poklesu koncentrace fenylpyruvátu v moči (Kubáčková a kol., 2014).

### 5.1 Dědičnost DPM

Dědičné poruchy metabolismu jsou onemocnění způsobovaná patogenními mutacemi v DNA zárodečných i somatických buněk pacienta. DMP je nejčastěji vázaná autosomálně recesivně, ale známe jsou i nemoci, která jsou vázaná na pohlavní chromosom X nebo se přenáší maternálně mutovanou mitochondriální DNA.

V rodinách s gonosomálně recesivním typem dědičnosti jsou nemocí postiženi hemizygotní chlapci a muži, u heterozygotních dívek a žen je klinická manifestace možná v případě vyšší míry inaktivace zdravého (nepostiženého) chromosomu X.

U malého počtu DPM se vyskytuje i dědičnost s autosomálně dominantním přenosem, například u některých typů dědičných poruch glykosylace (syndrom mnohočetných kostních

exostóz, EXT1/EXT2-CDG) nebo u některých mitochondriálních onemocnění (atrofie optiku-OPA1) (Kubáčková a kol., 2014).

## **5.2 Patogeneze DPM**

Dědičné poruchy metabolismu jsou nejčastěji podmíněné poruchou funkce enzymů. Jejich příčinou vzniku může být i porucha strukturálních proteinů, membránových transportérů a dalších pomocných proteinů. Typickým patogenetickým mechanismem při rozvoji DPM je hromadění substrátu enzymové reakce nad blokem, absence produktů pod blokem či kombinace obou mechanismů (Kubáčková a kol., 2014).

## **5.3 Klinické projevy**

Začátek a průběh onemocnění ovlivňují chemické vlastnosti jednotlivých nahromaděných látek, které dělíme na malé molekuly a velké komplexní molekuly.

V případě malých molekul jde o poruchu metabolismu exogenních látek, které jsou obsaženy ve stravě. Časem dochází k nahromadění některé aminokyseliny, která se projevuje obvykle už v prvním roce života. Postižená je funkce centrální nervové soustavy, jater, srdce nebo ledvin. Dalším způsobem projevu jsou například opakované ataky metabolického rozvratu. Mezi tyto onemocnění patří například leucinóza, galaktosemie, propionová acidurie atd.

Pokud jde o velké komplexní molekuly, nemoci jsou způsobené abnormálním metabolismem syntézy nebo degradace makromolekul. Mezi tyto makromolekuly můžeme zařadit glykosaminoglykany (mukopolysacharidy), glykoproteiny, složité glykolipidy a jiné. Výsledkem je porucha funkce buněčných membrán a organel, zejména lysosomů, peroxisomů a endoplazmatického retikula. Patří tam onemocnění jako je Fabryho nemoc, Gaucherova nemoc, infantilní cystinóza atd. (Kubáčková a kol., 2014).

## **5.4 Fenylalanin a jeho metabolismus**

Fenylalanin patří k esenciálním aminokyselinám, které lidský organismus dokáže přijímat jen v potravě. Fenylalanin se pomocí enzymu fenylalaninhydroxylázy (PAH) přeměňuje v procesu hydroxylace na aminokyselinu tyrozin. Konkrétně jde o proces, při kterém se hydroxylová skupina naváže na aromatické jádro fenylalaninu. Tyrozin se v následujících krocích odbourává



na dopamin, melanin a katecholaminy. Fenylalaninhydroxyláza je enzym, který ke své správné funkci potřebuje tetrahydropterin ( $\text{BH}_4$ ), který je jejím kofaktorem (Fernandes a kol., 2008).

## **5.5 Poruchy metabolismu fenylalaninu**

K odbourání fenylalaninu je nezbytná přítomnost enzymu fenylalaninhydroxylázy (PAH). Jeho správná funkce závisí na biopterinu ( $\text{BH}_4$ ), který plní úlohu kofaktoru. V případě, že je funkce biopterinu narušena, začínají se objevovat příznaky onemocnění fenylketonurie. Obdobní projevy mohou vznikat na základě defekce syntézy fenylalaninhydroxylázy v játrech, nebo když je fenylalaninhydroxyláza nefunkční.

V případě, že neprobíhá hydroxylace fenylalaninu na tyrozin, je spuštěna jiná metabolická cesta, která v lidském organismu není aktivní a má za následek hromadění látek jako je například fenylpyruvát (Reed, 2009).

Fenylketonurie má zásadní vliv na CNS. Proto ji zařazujeme k tzv. difuzní neurometabolické encefalopatii. Poškození mozku je zapříčiněno toxickými vlivy nahromaděného metabolitu (fenylalaninu), deficity potřebných metabolitů pro jeho správný vývoj, nebo poškozením, které vzniká sekundárně-poruchou vnitřního prostředí. Ke klinickým projevům patří epileptické záchvaty, zvracení a poruchy vědomí. U pokročilé encefalopatii se setkáváme s poruchami motorických funkcí se sekundárními epileptickými záchvaty. (Bednařík a kol., 2010)

Fenotyp fenylketonurika se v od zdravých lidí nijak výrazně neliší. Charakteristickým rysem je světlá barva vlasů a očí, která vzniká jako následek nedostatku melaninu (Silbernagl a kol., 2012).

Dalším a častým nálezem je katarakta očí (šedý zákal) (Kuchynka a kol., 2007).

### **5.5.1 Nedostatek fenylalaninhydroxylázy**

Fenylketonurie způsobena nedostatkem PAH je rozlišována podle procentuální funkčnosti PAH. Klasická PKU vzniká, když se aktivita PAH pohybuje pod 1% normální aktivity, kdy je plazmatická hladina Phe vyšší než  $1200 \mu\text{mol/l}$ . Mírná PKU je daná enzymatickou aktivitou PAH mezi 1 až 3% s plazmatickou hladinou Phe mezi  $600$  a  $1200 \mu\text{mol/l}$ . Posledním typem je mírná hyperfenylalaninémie (HPA), u které je aktivita PAH v rozmezí od 3 až 10% s plazmatickou hladinou Phe mezi  $120$  až  $600 \mu\text{mol/l}$  (Fernandes a kol., 2008).

### 5.5.2 Poruchy metabolismu biopterinu

Poruchy metabolismu biopterinu se rozlišují podle toho, zda jde o poruchu syntézy nebo o poruchu regenerace biopterinu. Defekt při syntéze  $\text{BH}_4$  je dán disfunkcí GTP-cyklohydrolázy nebo 6-pyruvoyl-tetrahydropterin syntázy, což jsou enzymy, které na sebe navazují při syntéze  $\text{BH}_4$ . U poruchy regenerace  $\text{BH}_4$  jde o defekci enzymu dihydrobiopterinu reduktázy, který  $\text{BH}_2$  po redukci s PAH obnovuje zpět na  $\text{BH}_4$ . Protože je  $\text{BH}_4$  kofaktorem nejen pro PAH, ale i pro hydroxylázy tyrozinu a tryptofanu, dochází při jeho defektu k mnohem rozsáhlejším problémům. Typická je například dětská forma Parkinsonovy choroby, která vzniká v důsledku nedostatku neurotransmiterů a akumulaci pterinů (Muntau a kol., 2009).

## 6. Fenylketonurie

### 6.1 Charakteristika

Fenylketonurie je autosomálně recesivně děděná choroba, která postihuje jedince, kteří od rodičů získali recesivní alely s deficitem PAH (fenylalaninhydroxylázy). Pro choroby, které jsou podmíněné autosomálně recesivně platí, že zdravím rodičům se může narodit postižené dítě, které je recesivním homozygotem (aa). Pak to znamená, že oba rodiče jsou heterozygoti pro daný gen (Aa). U rodičů se PKU neobjeví, a to díky přítomnosti zdravé dominantní alele, která převažuje nad defektní recesivní alelou. Rodiče jsou pouze přenašeči. Pravděpodobnost narození dítěte s PKU je 25 % pro každého potomka. Zdravý sourozenec postiženého dítěte může být pro sledovaný gen heterozygotem s pravděpodobností 2/3 nebo dominantním homozygotem s pravděpodobností 1/3. Obě pohlaví jsou postižena se stejnou pravděpodobností (Fernandes a kol., 2008).

### 6.2 Genealogie PKU

Důležitou částí pro vysvětlení dědičných nemocí je sestavení rodokmenu pomocí symbolů, které jednoduchým způsobem prezentují genotyp jedince v rodině. U autosomálně recesivních onemocnění se daná nemoc objevuje vždy ob jednu generaci (Fernandes a kol., 2008).

### 6.3 Zdravotní důsledky

Normální hladina fenylalaninu v plazmě zdravého člověka je nižší než 120  $\mu\text{mol/l}$ . Úroveň hladiny fenylalaninu u neléčené PKU může vystoupat na více než 1200  $\mu\text{mol/l}$ . U mírné PKU hladina kolísá mezi 200–450  $\mu\text{mol/l}$ . Hladina fenylalaninu od 360 do 600  $\mu\text{mol/l}$  může u dítěte vést k závažnému progresivnímu poškození rozvíjejícího se mozku. Od prvního do desátého roku dítěte je doporučovaná hladina fenylalaninu pod 360  $\mu\text{mol/l}$ . V období gravidity musí být hladina fenylalaninu udržována pod 360  $\mu\text{mol/l}$ , aby se zabránilo poškození plodu materální PKU. Podle mutací v genu pro PAH lze rozlišit mírnou hyperfenylalaninémii, mírnou PKU a těžkou PKU. PKU s  $\text{BH}_4$  senzitivitou, která lze léčit dodáváním organismu kofaktor  $\text{BH}_4$ , obsahuje mutaci pouze v jedné alele pro syntézu  $\text{BH}_4$ . Těžká PKU, u které  $\text{BH}_4$  nefunguje, je způsobená mutací na obou alelách.

Vysoká hladina fenylalaninu u dětí vede k patologické změně mozku postihující šedou i bílou hmotu. Změny se rozlišují na ovlivnění mozkového vyzrávání, poruchy myelinizace (izolace neuronů a přenos vzruchu) a snížení pigmentace mozku. Tyto patologické změny u neléčených dětí způsobují těžkou mentální retardaci a IQ těchto dětí bývá nižší než 50. Retardace postihuje hlavně řeč a nácvik hygieny. U neléčených dětí se také mohou objevit záchvaty v podobě spasmů (křeč s nadměrným stahem svalů), které mohou přejít do záchvatů tonicko-klonických křečí (napnutí svalů se záškuby, tonická extenze) podobným epileptickým záchvatu. Přestože je pozdní diagnostikování PKU spojeno s nevratným neurologickým poškozením, je po nasazení diety možné lehké zlepšení psychických testů. Také je popisován inhibiční vliv nadbytečného fenylalaninu na tvorbu melaninu, pigmentu tvořeného z metabolitů tyrozinu, což způsobuje charakteristický fenotypový vzhled jedince s PKU. U lidí s PKU se také objevuje patofyziologický ekzém, pro který ale není jasná příčina (Šťastná a kol., 2010; Hoffmann a kol. 2006; Menkes a kol., 2011).

#### **6.4 Maternální PKU**

Ženy s PKU mají vysokou náchylnost ke spontánním potratům. Dospělé ženy s PKU by před otěhotněním měly přejít na přísnou PKU dietu a měla by se jim pravidelně kontrolovat plazmatická hladina fenylalaninu v krvi matky. Aktivní přenos látek přes placentu, tzv. transplacentární transport, zásobuje plod potřebnými látkami ve zvýšeném množství. U fenylalaninu jde o 1,5násobek plazmatické hladiny Phe matky. U mírné PKU, kdy je hladina fenylalaninu v plazmě kolem 400  $\mu\text{mol/l}$  není vyžadovaná léčba. Toto množství fenylalaninu v mateřské plazmě je však pro plod toxické a může vést k mentální retardaci, mikrocefalii, faciální dysmorfii a vrozeným srdečním vadám (Hoffmann a kol. 2006).

#### **6.5 Psychologické dopady**

Děti s PKU, u kterých se začalo s léčbou včas, mají přesto nižší intelekt než jejich vrstevníci. Při vzrůstu plazmatické hladiny fenylalaninu o každých 100  $\mu\text{mol/l}$  klesá inteligenční kvocient (IQ) o 1,8 až 3,8 bodu. Přestože je poškození vývoje mozku v přímé souvislosti s plazmatickou hladinou fenylalaninu, byl ve výzkumech zjištěn psychologicky významný rozdíl v IQ mezi dětmi se stejnými hodnotami fenylalaninu v krvi. Nové důkazy vedou k závěrům, že intenzita poškození individuálně závisí na vývinu hematoencefalitické bariéry. Vývoj intelektu se zastavuje v období 10. Roku věku. Ve studiích byly zjištěny i poruchy vykonávaných funkcí.

Výkonové funkce zajišťují krátkodobou paměť, zaměření na určitý cíl, udržení pozornosti, sociální interakce atd. Porucha těchto funkcí významně přispívá k nepřizpůsobivosti dětí s PKU se o sebe starat, vyhýbat se potravinám, které nesmí, nezapomínat na bílkovinné náhražky (zpravidla v podobě nápojů) a dalších činnosti. Tyto faktory korelují se špatným začleněním do společnosti, znesnadněním vytvořením komunikačních schopností a tvorby vztahů. U 33 % dospívajících s PKU se vyskytuje více problémů ve škole než u jejich zdravých spolužáků, hlavně co se týče pozornosti, hláskování a matematiky. Pro identifikaci rozsahu poškození mozku slouží neuropsychologické vyšetření včetně např. vyšetření mozku pomocí zobrazovacích metod apod. Vyšetření zahrnuje popis chování, určení intelektuální výkonnosti a také stanovení možností zlepšení stavu vyšetřovaného. Tento diagnostický postup zohledňuje také věk, osobnostní faktory, momentální životní situaci a motivaci pacienta k vyšetření.

Mnoho studií se dnes zabývá kvalitou života dětí s PKU. Ve studiích dětí s PKU ze Švýcarska bylo zjištěno, že v období s vyšší plazmatickou hladinou fenylalaninu mají děti více problémů v oblasti poznávacích procesů a zvládáním vlastních emocí než u dětí s nižší hladinou fenylalaninu. V tomto období je zaznamenán i pokles sebevědomí a dobrých psychických stavů a prožitků radosti.

Podle studií lidé s PKU mívají často potíže s uplatněním v zaměstnání vzhledem ke svým problémům se studiem. Neuropsychologické testy dospělých s PKU prokázaly sníženou rychlost zpracování informací a problémy v oblasti pozornosti. Lidé s PKU mají větší sklon k depresím, úzkostným stavům a asociálnímu chování (Nečas a kol., 2005; Hoffmann a kol. 2006).

## 7.Diagnostika PKU

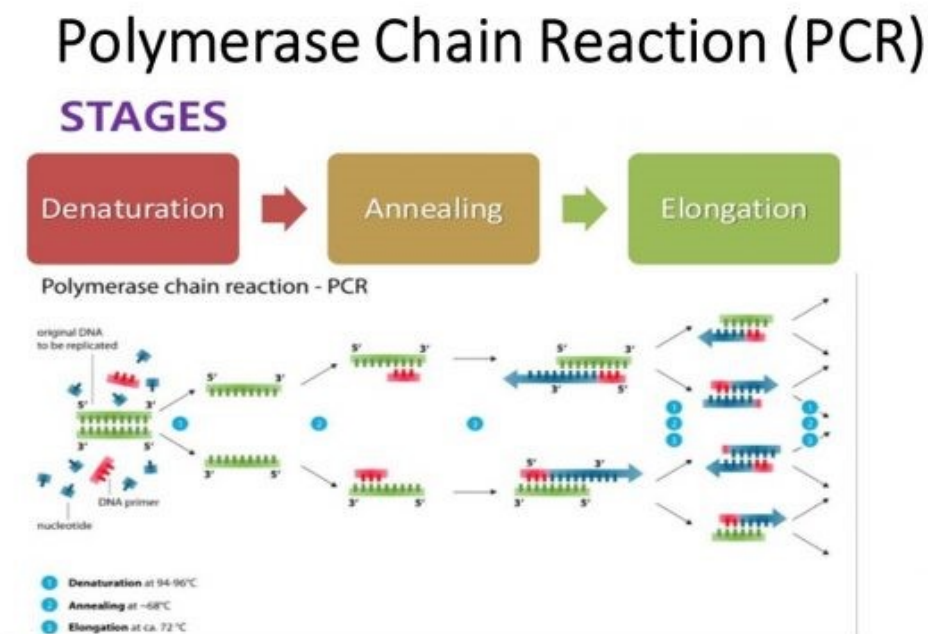
### 7.1 DNA diagnostika

V současnosti se mezi základní diagnostické metody používá polymerázová řetězová reakce (PCR). Provádí se v termocyklech, které dokáží během krátkého časového intervalu měnit a následně udržovat stabilní teplotu. Pro PCR jsou důležité hodnoty teplot: 50, 70 a 95 °C. K tomu, aby PCR mohla probíhat, musí být přítomna krátká sekvence DNA (primer). Vzhledem k náročnosti syntézy primerů, jsou tyto sekvence komerčně dodávány specializovaným laboratořím, které PCR provádí. Metoda vyžaduje přítomnost DNA polymerázy, která je odolná vůči vysokým teplotám. Mezi ne patří i často používaná termostabilní *Taq* DNA-polymeráza, která je extrahovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Dále jsou potřební i sekvence nukleotidů, které jsou základními stavebními jednotkami DNA.

Principem PCR je amplifikace (zmnožení) DNA sekvence, kterou právě určujeme. Po úvodní denaturaci dvouvláknové DNA získáme jedno vlákno původní, které označujeme jako templát. V dalším kroku se na templát váže primer. Prostřednictvím navázaného primeru a *Taq* DNA-polymerázy dojde k navazování nukleotidů a tedy k prodlužování vlákna. Cykly jsou opakovány až třicetkrát. Na konci PCR lze získat detekované množství produktu, které lze určit například pomocí elektroforézy.

Další možností DNA diagnostiky je hybridizace. U hybridizačních metod se používá tzv. sonda, komplementární s hledanou sekvencí. Pomocí restriční endonukleázy se DNA rozštěpí na určité fragmenty. Naštěpené fragmenty se elektroforeticky rozdělí a sonda vázaná na membráně se naváže a zviditelní tak hledanou sekvenci. Hybridizace se využívá i v metodice jako *in situ*. *In situ* doslova znamená „na svém místě“. Jedná se o cytogenetickou metodiku, u které jsou zvýrazněny přímo místa na chromosomech. Sondy se vážou na denaturované vlákno DNA přímo v chromosomu. Dnes jsou komerčně dostupné tzv. lokus specifické sondy, kterými lze přímo označit zkoumaný lokus na chromosomu. Značení sondami probíhá buď přímo, nebo nepřímě. Přímé sondy se komplementárně připojují bezprostředně na chromosom a intenzitu barvy nelze nijak zesílit. U nepřímých sond se využívá antigenu zvaného hapten (malá částice schopná vyvolat imunitní odpověď pouze při vazbě na látku větší molekulové hmotnosti), který je navázán na sondě. Na hapten se následně vážou značené protilátky. Na rozdíl od přímého značení sondami, lze u této metody barevnou intenzitu zesílit. Nejvýznamnější metodou v *in situ* hybridizaci je FISH (Fluorescent in situ hybridization) - fluorescenční *in situ* hybridizace.

Kombinací FISH metody se sondami různých haptenu vznikla, tzv. mnohobarevná FISH (mFISH). Pomocí až sedmí různých sond lze rozlišit každý jednotlivý pár chromosomů. Filtry na kameře rozliší jednotlivé malovací sondy označené fluorochromy. Počítačovým programem se k chromosomovým párům přiřadí barvy klasické nebo doplňující „pseudobarvy“. Z výsledků lze zjistit všechny chromosomové změny prostřednictvím druhé barvy na chromosomu. Podobný princip barvení chromosomů je používán u metody mnohobarevného pruhování, tzv. mBAND (multicolor chromosome banding). U této metody se nepoužívají chromosom specifické sondy, ale lokus specifické. Chromosom se obarví několika barvami, podle přítomnosti daných lokusů. Další příklad diagnostických metod využívá polymorfismus DNA s využitím PCR. Jedná se o metodu RFLP (restriction fragment length polymorphism)- délkový polymorfismus restrikčních fragmentů. Tato metoda se využívá převážně u rodin s anamnézou autosomálně dědičných chorob, ať už dominantních nebo recesivních. U postižených rodin RFLP využívá k určení přenosu mutovaných alel na děti. Princip metody je založen na „rozstříhání“ DNA v okolí sledovaného genu restrikčním enzymem na několik fragmentů. Vzniklé fragmenty jsou hybridizovány extragenovou sondou. Po elektroforéze vzniknou linie jednotlivých fragmentů, z nichž lze určit, zda se jedná například o heterozygotního jedince. Metod používaných pro DNA diagnostiku je velké množství. Vyjmenované metody jsou jedny z nejčastěji používaných (Lebl, Provazník, Hejčmanová, 2007; Clark, 2013).



Obrázek 12. PCR<sup>12</sup>

## 7.2 Historie novorozeneckého screeningu PKU

Screeningem označujeme vyšetření, kterým se preventivně vyšetřují lidé určité věkové skupiny a umožňují tak včasný záchyt zdravotních problémů.

Průkopníkem ve screeningu PKU a dalších metabolických chorob, byl Robert Guthrie, po kterém se screeningový test jmenuje. Guthrie použil citlivost bakterií na fenylalanin k vytvoření screeningového testu, ke kterému stačí kapka krve zaschlá na filtračním papíře. Po několika letech zavedení testů na PKU přišel Guthrie na další metabolity, které mohou stanovit další metabolické poruchy, například homocysteinurie, galaktosemie a další.

---

<sup>12</sup> Dostupné na: <https://www.xxpresspcr.com/all-news/polymerase-chain-reaction-the-past-present-and-future/>

Původní Guthrieho test, test bakteriální inhibice (bacterial inhibition assay –BIA), je prováděn tak, že se krevní skvrna na papírku položí na agar se sporami geneticky modifikovaného kmene *Bacillus subtilis*. Filtrační papírek, který je impregnovaný 2-thienylalaninem, inhibuje růst kultury za nepřítomnosti fenylalaninu. Pokud se v krevní skvrně fenylalanin vyskytuje, bakterie na agaru vyroste (Hoffmann a kol. 2006).



Obrázek 13. Genetický screening<sup>13</sup>

---

<sup>13</sup> Dostupné na : <https://www.medicalexpresscorp.com/>



### **7.2.1 Plošný screening**

Screening je plošně prováděn ve všech zemích Evropské unie, zpravidla ve druhém dni života novorozenců. Se screeningem se můžeme setkat u vyšetření na zjištění hladiny cholesterolu, glykémii a jiné. U novorozenců se screeningem vyhledávají choroby v co nejkratší době po narození, aby se zabránilo nevratnému poškození zdraví dítěte. Kromě PKU se screeningem vyšetřuje dalších 12 onemocnění. Ke včasnému zachytu onemocnění jsou používány tzv. screeningové testy, kterými se přímo v porodnici vyšetřují novorozenci 48 až 78 hodin po narození. (Hoffmann a kol. 2006).

Screeningová vyšetření provádějí v České republice laboratoře novorozeneckého screeningu v Praze, Brně a Ostravě (Lebl, Provazník, Hejčmanová, 2007).

The image shows a newborn screening card (Kartička) and a filter paper strip (filtrační papírku) with four blood spots. The card is from the Czech Republic and contains handwritten information about the newborn and mother. The filter paper strip is labeled '8690900'.

Kartičku vyplnit před odběrem Nedotýkat se oblastí pro kapky krve Při poškození kartičku nepoužít	
Jméno novorozence: <b>053173</b>	
Příjmení novorozence: <b>SE</b>	
Rodičské číslo - pečlivě ověřit: <b>025902/422</b>	
Datum a čas narození: <b>29.8.2004 - 18:00</b>	
Datum a čas odběru: <b>6.9.2004</b>	
Kódové číslo dítěte: <b>43213487</b>	Praktický lékařský MUDr. <b>Dr. NOVÁK</b>
Jméno matky: <b>73</b>	Adresa matky (pobyt): <b>M. P. 150/12</b>
Telefon matky (pobyt): <b>73</b>	Odeslatel vzorku: <b>025902/422</b>
ÚSTAV PRO PÉČI O MATEŘI A DÍTĚ Podlaží národní 157 PSC 147 03 PRAHA - PODOUL pediatrická poliklinika / POK	

Obrázek 14. Kapky krve na filtračním papírku odebrané z patičky novorozence<sup>14</sup>

<sup>14</sup> Dostupné na: <https://www.medicaexpresscorp.com/employee-drug-testing-services/background-screening/>

### **7.3 Biochemické vyšetření fenylketonurie**

Biochemické analýzy jsou používány k potvrzení či vyvrácení pozitivních screeningových testů a označují se jako druhý stupeň screeningu. Biochemické vyšetření probíhá v laboratořích na analyzátorech, čímž se výrazně zvyšuje přesnost testů a snižuje se potřeba testy opakovat.

I přes pravidelné přezkoumávání správnosti screeningových testů, může dojít k falešně pozitivní či negativní chybě. Falešně pozitivní výsledek znamená, že vzorek krve novorozence, který byl vyhodnocen jako pozitivní, je ve skutečnosti v pořádku a dítě nemocné není. Tyto falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny fyziologickou změnou stanovované látky ve vzorku, enzymatické nezralosti u předčasně narozených dětí, jaterním onemocněním anebo podáváním antibiotik obsahujících dimethylpropionovou kyselinu. (Lebl, Provazník, Hejčmanová, 2007).

Falešně negativní výsledek znamená, že dítě je podle testu v pořádku, ale ve skutečnosti je nemocné. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny normální hodnotou analytu v době odběru nebo laboratorní chybou. Riziko falešně pozitivního výsledku se více objevuje (staticky) u děvčat než u chlapců až o 48 %. Při poklesu váhy dítěte o 100 g se riziko falešně pozitivního výsledku zvyšuje o 4,2 % (Lebl, Provazník, Hejčmanová, 2007).

#### **7.4 BH<sub>4</sub> senzitivita**

Před zahájením léčby u dítěte je nutno nejdříve vyšetřit, o jak závažnou formu PKU se jedná. K vyloučení deficitu BH<sub>4</sub> se využívá metoda označovaná jako BH<sub>4</sub> zátěžový test. Dítěti je podáváno 20mg BH<sub>4</sub> na kilogram hmotnosti rozpuštěných ve 20 až 30 ml vody. Hodnoty fenylalaninu v plazmě a moči jsou analyzovány ve vzorků odebraných před podáním, po 4, 8 a následně 24 hodinách. Během testu je dítě normálně kojeno. Touto metodou získáváme přehled postupného zvyšování, poklesu a minimální hladiny Phe během 24 hodin. Podle výsledků BH<sub>4</sub> zátěžového testu můžeme PKU rozdělit na to, zda jde o defekt PAH bez BH<sub>4</sub> senzitivity nebo o defekt PAH s BH<sub>4</sub> senzitivitou. Pokud jde o PKU s BH<sub>4</sub> senzitivitou, poškození se vyskytuje v oblasti syntézy a regenerace BH<sub>4</sub>. U zátěžového testu se BH<sub>4</sub> senzitivita prokáže poklesem koncentrace Phe v plazmě až o 30 % (Fernandes, 2006; Zaffanello, 2003).

#### **7.5 Prevence**

K preventivním krokům kromě screeningových testů novorozenců patří i určitá míra informovanosti obyvatelstva, kterou zajišťuje Ministerství zdravotnictví. V rámci mezinárodní asociace pro vzácná onemocnění byl stanoven na 29 února Světový den vzácných onemocnění (mimo přestupný rok na 28. únor). Na tento den jsou pořádány akce, které poukazují na situaci pacientů a jejich rodin. Světové dny vzácných onemocnění jsou organizovány ve 24 zemích EU neziskovou organizací EURORDIS (Národní akční plán pro vzácná onemocnění, 2015-2017).

## 8. LÉČBA

V dnešní době je jedinou možnou léčbou v závislosti na podstatě příčiny PKU finančně nákladná dieta potravinami s nízkým obsahem fenylalaninu, která musí být dodržována po celý život, nejdůsledněji však v dětství a dospívání. V ČR zajišťuje léčbu a sledování pacientů s PKU Ústav metabolických poruch a Klinika dětského a dorostového lékařství Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a Fakultní nemocnice Brno (Menkles a kol., 2011; Montau, 2009).

### 8.1 Dietologie

Dietní režim sleduje specialista na výživu, tedy lékař zabývající se metabolickými chorobami a rodiče, kteří ručí za sledování diety dítěte. Kontroly hladiny fenylalaninu se provádí v prvním půlroku života 2krát týdně, později 2krát měsíčně. Typ diety závisí na druhu PKU a na míře závažnosti nemoci (Menkles a kol., 2011; Montau, 2009).

#### 8.1.1 Potraviny a výživa

U diety se musí vyloučit potraviny s vysokým obsahem bílkovin. Lidské mateřské mléko je na Phe relativně chudé, děti s PKU mohou být kojeny spolu s dokrmováním přípravky s Phe. Přirozené potraviny s nízkým obsahem Phe jsou například sacharidy, některé druhy zeleniny a ovoce. Z pohledu zdravých lidí nemohou fenylketonurici jíst téměř nic. Kromě masa, obilovin, ořechů a luštěnin musí lidé s PKU odmítnout i většinu zeleniny a nápoje s obsahem aspartamu (umělá sladidla). Dieta u dětí s PKU je individuální. Kromě prvních měsíců života je denní příjem fenylalaninu tolerován na 12-24 mg na kilogram hmotnosti. Seznam potravin, které jsou vhodné pro dietu, lze nalézt v brožurkách, které dostávají rodiče od lékaře po zjištění nemoci nebo na internetových stránkách určených pro nemocné PKU a jejich okolí (Menkles a kol., 2011; Montau, 2009).

Potravinami určenými pro speciální diety se zbývá Zákon o potravinách. Speciálně o fenylalaninu pojednává Vyhláška č.54/2004 Sb. Definicí potravin neobsahujících fenylalanin se zabývá v této vyhlášce § 16.

*„Potravinami bez fenylalaninu se rozumějí potraviny vyrobené zvláštním technologickým postupem tak, aby obsah fenylalaninu nebyl vyšší než 20 mg ve 100 g nebo 100 ml potraviny ve*

*stavu určeném ke spotřebě. U potravin vyrobených ze surovin přirozeně neobsahujících fenylalanin musí být jeho obsah nulový.“*

*„Potraviny bez fenylalaninu jsou určeny pro osoby s vrozenou, geneticky podmíněnou poruchou metabolismu fenylalaninu.“*

O potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití hovoří § 17. Podle §17 vyhlášky musí být potravina bez Phe používána na základě doporučení lékařem, na obalu potravin musí být napsána energetická hodnota, obsah Phe ve 100 g potraviny, obsah vitamínů a minerálů atp. Pro dodání potřebných aminokyselin, především tyrozinu, vitamínů a minerálů, jejichž příjem může být dietou snížen, jsou vyráběny produkty, které potřebné látky dodávají. Ve státech Evropské unie vyjdou bílkovinné náhrady pro děti (2-8 let) a pro dospělé na 4300 až 21 500 eur. Proteinové náhrady jsou v některých zemích EU plně hrazeny pojišťovnou, například v Itálii a Anglii, na rozdíl od Polska, Španělska a Nizozemí, kde finanční podpora neprobíhá. U dalších zemí jsou příspěvky limitovány. Bílkovinné náhrady jsou označovány jako potraviny pro zvláštní léčebné účely. Potraviny pro zvláštní léčebné účely jsou většinou objednávány prostřednictvím metabolické kliniky a je částečně nebo úplně proplácena z veřejného zdravotního pojištění. Zdravotní pojišťovny neproplácí nízkoproteinové potraviny. Nulový příspěvek pro nákup potravin na dietu a snižující se sociální podpora rodin s dětmi od 1 roku do 7 let, které potřebují neustálou péči, přivádí mnoho rodin do problémů (Fernandes a kol., 2008; Montau, 2009; Neroval a kol., 2003).

### **8.1.2. Defekt PAH s BH<sub>4</sub> senzitivitou**

V případě špatné syntézy BH<sub>4</sub> je léčba v mnohém snazší. Stačí dodávat BH<sub>4</sub> v denní dávce 10-15 mg na kilogram hmotnosti nemocného. Farmakem s BH<sub>4</sub> je například Kuvan, který byl evropskou komisí schválen a registrován v roce 2008 pro celou EU. V ČR je dostupný od 1.9.2012. Léčivou látkou je sapropterin dihydrochlorid, který je syntetickou kopií BH<sub>4</sub>. Tablety se podávají perorálně (ústí). Kvůli poruše metabolismu pterinů může dojít k problému v metabolismu aminů v centrálním nervovém systému, což se řeší dodáváním neurotransmiterů (Montau, 2009).

## **8.2 Enzymová substituční terapie**

V dnešní době probíhá řada studií umělého dodávání enzymů. U PKU se jedná o náhradu enzymem fenylalaninaminolyázou (PAL). PAL je enzym mnohem jednodušší a stabilnější než PAH a nevyžaduje žádný kofaktor. Tento enzym odštěpí z fenylalaninu amino skupinu a vznikne kyselina skořicová, která je pro organismus bezpečná a vyloučí se močí. PAL pochází z řasy rodu *Anabaena variabilis*, který je odolnější proti proteolytickým pochodům. V klinických testech nebyly zaznamenány vedlejší účinky a zatím probíhají studie o bezpečnosti a účinnosti opakovaného dodávání enzymu. Zkoumá se orální podávání a subkutánní injekce (Menkles a kol., 2011; Montau, 2009).

### 8.3 Genová terapie

Rozvoj genetiky a genové terapie je nadějí pro mnoho nemocí. Největší část pokusů o genovou terapii zastupují nádorová onemocnění, monogenní choroby, infekční nemoci a kardiovaskulární choroby. Podle typu modifikovaných buněk rozlišujeme zárodečnou nebo somatickou genovou terapii. Zárodečná genová terapie je v mnoha zemích zakázaná, vzhledem k etickým rozporům a nejasným důsledkům zákroku na gametě či zygotě. Veškeré genové terapie člověka se provádí formou modifikovaných somatických buněk. Modifikace somatických buněk mohou probíhat několika způsoby. Buňky mohou být odebrány od pacienta a po modifikaci se vrátí do organismu (*ex vivo* terapie). Buňky, které jsou vhodné pro genovou terapii, mají dlouhou životnost, proliferují a dají se snadno získat. Samotná modifikace buněk probíhá prostřednictvím vektorů s cizím genem. Jako vektory jsou nejčastěji používány viry. Významné jsou vektory z retrovirů, které díky reverzní transkriptáze přepíší svou RNA do DNA. Dalším typem virových vektorů je adenovirus, adeno-asociovaný virus a lentivirus. Kromě virových vektorů jsou zkoumány i nevirové vektory. Nejvíce studované nevirové vektory jsou liposomy, uměle vytvořené částice s fosfolipidovou dvouvrstvou a inzertovanou DNA uvnitř. Oproti virovým vektorům však mají velmi malou účinnost.

Ve fázi výzkumu je léčba zavedením PAH genu do jaterních buněk, který by „obnovil“ enzymatickou tvorbu. Adeno-asociovaný virus (AAV), vhodný pro genetickou terapii, není patogenní, zánětlivý a jeho zavedení by mělo vyvolávat imunitní reakci jen minimálně. AAV s lidským PAH genem zavedený do myších jater přechází do buněčného jádra, kde je přepsán do DNA. Myšim s PKU byl injekcí do portální žíly dodán genový vektor (sérotyp 8). U myší byla prokázána fenotypová změna, kdy došlo k pigmentaci srsti už od 2 týdnů léčby a také došlo k výraznému snížení plazmatického Phe na normální hladinu na déle jak jeden rok. Testy jater zkoumaných myší prokázaly, že nedochází k rakovinnému bujení či známkám toxicity.

Přestože byly výsledky na myších velmi dobré, genová terapie nevede k trvalému odstranění problému nízké aktivity PAH. Genový vektor není integrován v jaterní DNA a postupnou regenerací jaterních hepatocytů dochází k vymizení účinků vektoru. Opětovné dodání stejného sérotypu není účinné, přestože v organismu dojde k imunitní odpovědi a jeho následnému zničení. Možnost léčby metabolických onemocnění jater pomocí buněk kostní dřeně prokázala i studie na myších s genetickým defektem vedoucím k tyrozinémii (Menkles a kol., 2011; Montau, 2009).



## 9. Statistika PKU v ČR a Evropských zemích

V rozmezí mezi 1.1.2002 a 31.12.2006 se v České republice narodilo 492 177 dětí, přičemž u 56 dětí se potvrdila diagnóza PKU. Výskyt dětí s PKU v tomto období je narození 1 postiženého dítěte na 8789 zdravých dětí. V České republice je PKU nejčastěji způsobena mutací označovanou jako R408W (z 60 %). Tto zkratka udává číslo kodonu (408) a záměnu sekvence pro ariginin (R) za sekvenci pro tryptofan (W). Další vyskytující se mutací je R158Q, u které se na kodonu 158 zaměnila sekvence argininu za glycin (Q).

Ve 41 evropských zemích, kde je zaveden screening, je průměrná prevalence výskytu PKU 1:8000. Screening se neprovádí na Maltě a ve Finsku z důvodu nízké prevalence. Z genetického hlediska je rozmanitost alel PAH vidět v rámci regionální populace např. v Evropě nebo mezi rasami (bělochy, asiaty). Analýza 9000 evropských chromosomů dokázala 29 různých mutací, z nichž se vyskytuje každá s relativní četností nad 3 %. Různé sady alel fenotypu pro HPA není náhodně rozdělena, což ukazuje na regionální asociaci. Všechny závěry naznačují rozmanitý původ PKU v Evropě. Žádná samostatná mutace ve všech evropských populacích nepřevládá. V některých lokalitách zemí EU je výskyt PKU mnohem vyšší. Jedná se například o region Katalánska (Španělsko), kde je prevalence dokonce 1:5000 (Votava, 2008; Kohoutová 2012).

## 10. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo shrnout dostupné informace o fenylketonurii a uspořádat je do dílčích kapitol z hlediska genetického, biochemického a z pohledu zdravotních aspektů, které toto onemocnění provází. Spolu s diagnostickými metodami, dále metodami prevence a léčby byla zpracována i statistická část zaměřená na prevalenci výskytu PKU v ČR a ostatních zemích Evropské unie.

Poprvé byla fenylketonurie popsána v roce 1934 Asbjörnem Föllingem jako Imbecilitas phenylpyruvica podle charakteristického zápachu fenylpyruvátu v moči pacientů. Fenylketonurie (PKU) je charakterizována jako difúzní neurometabolická encefalopatie. Příčinou poškození mozku je toxický vliv nadbytku fenylalaninu v CNS. Další ireverzibilní patologické změny jsou způsobené nedostatkem metabolitů fenylalaninu a následně dochází i k porušení homeostázy. Nadbytečné množství Phe v mozku je mimo jiné způsobeno nedostatečně vyvinutou hematoencefalickou bariérou u dětí. Vysoká hladina fenylalaninu u dětí způsobuje výrazný pokles IQ až pod 50.

PKU se řadí mezi autosomálně recesivní onemocnění (AR), způsobené mutací na dlouhém raménku 12. chromosomu v lokusu 22 až 24. Mutace v tomto lokusu způsobuje defekt syntézy fenylalaninhydroxylázy, enzymu zpracovávající přeměnu aminokyseliny fenylalaninu na tyrozin. Podle charakteru mutace lze PKU rozlišit na klasickou, u které lze mutaci zmapovat na lokusu a stejných alelách; mírnou, která se od klasické liší rozdílnými alelami a zvláštní typ PKU, kterou na lokusu zmapovat nelze. V rodinách s anamnézou PKU je výskyt dědičného onemocnění zpravidla ob jednu generaci.

PKU je dále diferencována (kromě detekce na alelách) podle funkčnosti PAH. Při aktivitě enzymu nižší než 1 % normy je označována PKU jako klasická. Dalším typem je mírná PKU s aktivitou enzymu mezi 1–3 % a non PKU (neboli mírná HPA) s aktivitou enzymu, která se klinické obtíže, způsobené nedostatkem metabolitů tyrozinu a tryptofanu, což vede k deficitu neurotransmiterů, akumulaci pterinů v organismu a nakonec až tzv. dětské formě

organismu nasyntetizovaná aminokyselina tyrozin slouží k tvorbě hormonů štítné žlázy, katecholaminů a melaninu. Nedostatek melaninu se fenotypově projevuje charakteristickým

vzhledem pacientů s PKU – světlé vlasy a modré oči. Melanin se kromě kožního pigmentu vyskytuje i v nervové soustavě. Léčba PKU vychází z přísné nízkoproteinové diety, jejímž prostřednictvím se plazmatická hladina Phe udržuje v relativně nízké koncentraci. Největším rizikem je vysoká hladina Phe pro děti, protože může dojít k tomu, že se fenylalanin a jeho patologické metabolity začnou ukládat v mozku. Dalším rizikovým obdobím v životě člověka s PKU je období těhotenství, kdy vyšší hladina Phe v plazmě matky může poškodit plod díky transplacentárnímu přenosu.

Diagnostika PKU probíhá prostřednictvím novorozeneckého screeningu, kdy se ze vzorku suché kapky krve určí koncentrace Phe v krvi. Nejvíce používanými metodami diagnostiky PKU je hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie a z metod DNA diagnostiky např. RFLP.

V online katalogu Mendelovských dědičností u člověka (Online – Katalog Mendelian Inheritance in Man – OMIM) je PKU zařazena pod zkratkou MIM 261600. Podle statistických dat se v České republice rodí jedno dítě s PKU na 8789 zdravých dětí, což je mnohem nižší výskyt než v ostatních zemích EU, kde je udávána hodnota prevalence výskytu 1:8000. Prevalence PKU je vyšší v přirozeně ohraničených oblastech (ostrovy, regiony ohraničené pohořími...), např. Katalánsko, Skotsko a Irsko. Až na výjimky probíhá ve 41 zemích EU celoplošný novorozenecký screening pro včasné odhalení vrozených chorob.

## 11. Seznam použitých informačních zdrojů

1. ALBERTS, B., Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky, 2.vyd., Ústí nad Labem, Espero, 2005, ISBN 80-902906-2-0
2. BEDNAŘÍK J., Klinická neurologie, Triton, Praha, 2010, ISBN 978-80-7387- 389-9
3. BÉLANGER-QUINTANA, A., Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria, Molecular Genetics and Metabolism, Srpen 2011, vol. 104, page S19-S25, ISSN 1096-7192
4. BÉLANGER - QUINTANA, A., Diet in phenylketonuria: A snapshot of special dietary costs and reimbursement systems in 10 international centers, Molecular Genetics and Metabolism, listopad 2011, vol. 105, page 390-394, ISSN 1096- 7192
5. BENDER D. A., Amino acid Metabolism, 3.vyd., Sussex, UK, Wiley - Blackwell, 2012, ISBN 978-0-470-66151-2
6. BLAHOŠ J., Endokrinologie – interdisciplinární obor, Triton, Praha, 2006, ISBN 80-7254-788-7
7. BERCOVICH D., Genotype – phenotype correlations analysis of mutations in the phenylalaninehydroxylase (PAH) gene, Journal of Human Genetics, březen 2008, col. 105, page 390 – 394, ISSN 1096-7192
8. CLARK P. D., Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution, Elsevier Inc., Oxford, 2. Vyd., 2013, ISBN 978-0-12-378594-7
9. ČESKÁ REPUBLIKA, Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu, Věstník Ministerstva zdravotnictví, 2009, č. 6, str. 7-14, dostupný online na webových stránkách ministerstva zdravotnictví: [http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik\\_3620\\_1772\\_11.html](http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik_3620_1772_11.html)
10. ČESKÁ REPUBLIKA, Národní akční plán pro vzácná onemocnění na léta 2012 – 2014, Usnesení vlády ČR ze dne 29. srpna 2012 č. 633, ke stažení na <http://vzacna-onemocneni.cz/>
11. FERNANDES, J. Diagnostika a léčba metabolických poruch, 4.vyd. Praha, Triton, 2008. ISBN 978-80-7387-096-6
12. FILIP, S., Kmenové buňky; Biologie, medicína, filozofie, 1.vyd., Praha, Galén, 2006, ISBN 80-7262-401-6
13. FLETCHER H., BIOS instant notes; Genetics, 4.vyd., New York, Garland science, 2013, ISBN 978-0-4156-9314-1
14. GROSSE, S. D., Late – Treated Phenylketonuria and Partial Reversibility of Intellectual Impairment: Child development, leden / únor 2010, vol. 81, issue 1, s. 200-211, ISSN 1467-8624
15. GENTILE, J. K., Psychosocial aspects of PKU: Hidden disabilities – A review, Molecular Genetics and Metabolism, vol. 99, s 64–67, říjen 2009, ISSN 1096- 7192
16. HOEDT A. E., “MY PKU”: increasing self - management in patients with phenylketonuria. A randomized controlled trial, Orphanet journal of rare disease, 2011
17. HOFFMANN, G. F., Dědičné metabolické poruchy, 1.vyd. Praha, Grada, 2006, ISBN
18. IKEDA, K. Phenylalanineammonia – lyase modified with polyethyleneglycol: Potential therapeutic agent for phenylketonuria, Amino Acids, listopad 2005, vol. 29, no. 3, s. 283-287, ISSN 1438-2199
19. KASNAUSKIENĖ J., Predicting a clinical / biochemical phenotype for PKU / MHP patients with PAH gene mutation, Russian journal of genetics, říjen 2008, vol. 44, issue 1212-1218, ISSN 1608-3369

20. KITTNAR O., Lékařská fyziologie, 1.vyd., Praha, Grada, 2011, ISBN 978-80- 247-3068-4
21. KOČÁREK, E., Molekulární biologie v medicíně, 1. Vyd., Brno, Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských oborů, 2007, ISBN 978-80-7013-450-4
22. KOOLMAN J., Barevný atlas biochemie, 1. vyd., Praha, Grada, 2012, ISBN 978- 80-247-29977-0
23. KUCHYNKA P., Oční lékařství, 1. Vyd., Praha, Galen, 2007, ISBN 978-80-247- 1163-8
24. LEBL a kol., Preklinická pediatrie, 2. Vyd., Praha, Galen, 2007, ISBN 978-80- 7262-438-6
25. LOEBER J. G., Neonatal screening in Europe; the situation in 2004, Journal of Inherited Metabolic Disease, červenec 2007, vol. 30, s. 430-438, ISSN 1573- 2665
26. MARSDEN, D. Newborn screening for metabolic disorders, The Journal of Pediatrics, květen 2006, vol. 148, issue 4, s. 577-584, ISSN 0022-3476
27. NEVORAL J. a kol, Výživa v dětském věku, Jihlava, Nakladatelství H&H Vyšehradská s.r.o., 1.vyd., 2003, ISBN 80-86-022-93-5
28. OTOVÁ, B., Lékařská biologie a genetika 1. díl, Praha, Karolinum, 2008, 1.vyd, ISBN 978-80-246-1594-3
29. PRITCHARD D. J., Základy lékařské genetiky, Praha, Galén, 1.vyd., 2007, ISBN 978-80-7262-449-2
30. PRITCHARD D. J., Medical genetics at a Glance, India, Replika Press, 3.vyd., 2006, ISBN 978-0-632-06372-7
30. PROCHÁZKOVÁ, D., Představujeme metabolická centra v ČR a SR, Metabolík, 2004, č. 2, s. 3, ISSN 1214-3057
31. RANDHAWA M., Evidence for the ectopic syntesis of melanin in human adipose tissue, The FASER Journal, březen 2009, vol. 23, s. 3835-3843, ISSN 0892-6638 (online ISSN: 1530-6860)
32. REED, S. Essential Physiological Biochemistry, 1.vyd. Singapore: Markono Print Media Pte Ltd., 2009, ISBN 978 0 470 02635 9
32. ROSENTHAL, M., D., Medical biochemistry: human metabolism in health and disease, 2.vyd., USA, nakl. Wiley, 2009, ISBN 978-0-470-12237-2
33. SAUDUBRAY, J. M., Inborn metabolit diseases: Diagnosis and treatment, 5.vyd. Würtzburg: Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2006, ISBN 978-3-642- 15719-6
34. SCRIVER, C. R., The PAH Gene, Phenylketonuria, and a Paradigm Shift, Human mutation, duben 2007, vol. 28, issue 9, ISSN 1098-1004
35. SILBERNAGL S., Atlas patofyziologie, Praha, Grada, 2012, 2. Vyd., ISBN 978- 80-247-3555-9

- 36.SVAČINA, Š., Poruchy metabolismu výživy, 1.vyd. Praha, Galén, 2010, ISBN 978-80-7262-676-2
- 37.ŠŤASTNÁ, S., Metabolická příručka 2010, Praha, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, ISBN 978-80-254- 6659-9
- TARSOUNAS, M., Telomere Maintenance Requires the RAD51D Recombination / Repair Protein, CELL, duben 2004, vol. 117, p 337-347, ISSN 0092-8674
- 38.THOMPSON, J. S., Klinická genetika, Praha, Triton, 2004, ISBN 80-7254-475-6
- 39.THÖNY, B., Long – term correction of murine phenylketonuria by viral gene transfer: liver versus muscle, JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE, únor 2010, vol. 33, numb. 6, ISSN 1573-2665
- 40.VOTAVA, F., Novorozenecký screening v České republice a v Evropě, ČESKO-SLOVENSKÁ PEDIATRIE, 2008, ročník 63, s. 95-105, ISSN 0069 – 2328
- 41.WICKS N. L., UVA Phototransduction Drives Early Melanin Synthesis in Human Melanocytes, Current Biology, listopad 2011, vol. 21, issue 22, s. 1906 – 1911, ISSN 0960-9822
- 42.ZAFFANELLO M., Neonatal birth parameters of positive newborns at PKU screening as predictors of false positive results at recall testing, Journal of medical screening, 2003, vol. 10, s. 181-183, ISSN 1475-5793

